



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Instituto de Biologia

DENNYS GHENRY SAMILLAN ORTIZ

**INVESTIGAÇÃO DA PRESENÇA DE FEROMÔNIOS EM QUATRO ESPÉCIES
DE FLEBOTOMÍNEOS (DIPTERA: PSYCHODIDAE) E ATRATIVIDADE DE
CAIROMÔNIOS HUMANOS EM CAMPO**

**STUDY ON PHEROMONES IN FOUR SPECIES OF PHLEBOTOMINE SAND
FLIES (DIPTERA: PSYCHODIDAE) AND ATTRACTIVENESS OF HUMAN
KAIROMONES IN FIELD**

CAMPINAS

2019

DENNYS GHENRY SAMILLAN ORTIZ

**INVESTIGAÇÃO DA PRESENÇA DE FEROMÔNIOS EM QUATRO ESPÉCIES
DE FLEBOTOMÍNEOS (DIPTERA: PSYCHODIDAE) E ATRATIVIDADE DE
CAIROMÔNIOS HUMANOS EM CAMPO**

**STUDY ON PHEROMONES IN FOUR SPECIES OF PHLEBOTOMINE SAND
FLIES (DIPTERA: PSYCHODIDAE) AND ATTRACTIVENESS OF HUMAN
KAIROMONES IN FIELD**

Tese apresentada ao Instituto de Biologia
da Universidade Estadual de Campinas
como parte dos requisitos exigidos para a
obtenção do título de Doutor em Biologia
Animal, na Área de Relações Antrópicas,
Meio Ambiente e Parasitologia.

*Thesis presented to the Institute of Biology
of the University of Campinas in partial
fulfillment of the requirements for the
degree of Doctor in Animal Biology in the
field of Anthropic Relations, Environment
and Parasitology.*

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA
PELO ALUNO DENNYS GHENRY
SAMILLAN ORTIZ, E ORIENTADO PELA
PROFA. DRA. MARA CRISTINA PINTO.

Orientadora: Profa. Dra. MARA CRISTINA PINTO

CAMPINAS

2019

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

Or8i Ortiz, Dennys Ghenry Samillan, 1980-
Investigação da presença de feromônios em quatro espécies de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) e atratividade de cairomônios humanos em campo / Dennys Ghenry Samillan Ortiz. – Campinas, SP : [s.n.], 2019.

Orientador: Mara Cristina Pinto.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Flebotomíneo. 2. Cairomônios. 3. Feromônios. 4. Microextração em fase sólida. 5. Ácidos láuricos. 6. Ecologia química. I. Pinto, Mara Cristina. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Study on pheromones in four species of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) and attractiveness of human kairomones in field

Palavras-chave em inglês:

Sand flies
Kairomones
Pheromones
Solid phase microextraction
Lauric acids
Chemical ecology

Área de concentração: Relações Antrópicas, Meio Ambiente e Parasitologia

Titulação: Doutor em Biologia Animal

Banca examinadora:

Mara Cristina Pinto [Orientador]
Eunice Aparecida Bianchi Galati
Lígia Miranda Ferreira Borges
Cláudio Casanova
Carlos Eduardo Almeida

Data de defesa: 10-05-2019

Programa de Pós-Graduação: Biologia Animal

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0001-5841-8619>
- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/7705728940091472>

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Mara Cristina Pinto

Profa. Dra. Eunice Aparecida Bianchi Galati

Profa. Dra. Lígia Miranda Ferreira Borges

Prof. Dr. Prof. Dr. Carlos Eduardo de Almeida

Prof. Dr. Cláudio Casanova

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

DEDICATÓRIA

Dedico a minha esposa, aos meus pais
e irmãos com muito amor e carinho.

*“Y si después de asomarte tanto en tanto esbozaras un quejido,
solo sería un punto y coma entre el respiro propio e impropio de la vida misma,
solo serías eco de una fe mordida en el limbo de mis años”*

Silvia Ortiz.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela oportunidade de realizar mais esse sonho, por tornar realidade tudo isto, por cuidar da minha família, por cuidar de mim e de todos aqueles que eu amo! Sou grato a Ele por colocar no meu caminho pessoas maravilhosas que fizeram destes sete anos, simplesmente perfeitos. Além do aprendizado, amizades, e experiências, ganhei um segundo lar, o Brasil, terra linda, com uma grandeza que vai além de sua natureza; é grande pelas pessoas que aqui vivem e me fizeram sentir em casa.

Agora vem a parte mais difícil desta história mencionar cada uma das pessoas que colaboraram durante meu caminho, fica difícil e até acho injusto; para um desmemoriado como eu, mas farei o meu melhor, é importante destacar que a ordem não necessariamente reflete predileção.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela bolsa recebida (Proc.: 140363/2015-7), financiamento que fez possível a realização do meu trabalho de doutorado no Instituto de Biologia Animal da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP.

Ao programa de pós-graduação em Biologia Animal do Instituto de Biologia pela oportunidade que tive de realizar o meu doutorado nesta prestigiosa universidade.

Gostaria de agradecer à minha orientadora e amiga, a Profa. Mara Cristina Pinto pelo imensurável apoio durante o desenvolvimento do meu trabalho de doutorado. Agradeço-lhe pela paciência, apoio, motivação e pela orientação, por cada momento do nosso convívio, desde o planejamento de cada ensaio até a escrita desta tese.

Meus agradecimentos ao Prof. Dr. João Aristeu pela possibilidade de realizar os meus ensaios no laboratório de Parasitologia que ele e a Profa. Mara são responsáveis na Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Campus Araraquara. Obrigado também pelos conselhos, sem eles não seria possível realizar essa pesquisa.

A Dra. Silmara Alegretti, pelos ensinamentos, companhia, amizade, exemplo de vida, sem você nada disso seria possível, eternamente grato.

A Dra. Marlene Tiduko, Dra. Fernanda Cabral, obrigado pelos ensinamentos e amizade durante todo o este percurso.

A Dra. Eunice pelo imenso apoio e ensinamentos na identificação dos flebotomíneos e na discussão dos artigos.

Ao Dr. Danilo Ciccone, pelas sugestões recebidas durante o exame de qualificação, pelo ensinamento e amizade. Muito obrigado.

Ao Dr. Claudio Casanova, pelas orientações e ajuda durante a coleta de flebotomíneos em campo.

A Dra. Luzia Trinca, pela colaboração e ensinamentos em estatística, pela disposição para tirar todas as nossas dúvidas e pela ajuda na elaboração do artigo.

A Dra. Marili Villa Nova Rodrigues, pelos ensinamentos em relação ao SPME, pelas sugestões recebidas durante o exame de qualificação e durante a elaboração do artigo.

Ao Instituto Federal de Matão, na pessoa do Dr. Christiann D. Tosta, pelos ensinamentos em relação à cromatografia gasosa; muito obrigado por todas as orientações recebidas. Ao professor Alexander Cestari e aos servidores técnicos: Guilherme Pegler, Yuri Araujo, Ivânia Santos, Janaína da Silva e Guilherme Christiani; pelo auxílio durante as análises cromatográficas.

A Diones Borges, colega de mestrado e amigo de sempre. Obrigado pela força durante as coletas; quatro horas da manhã, aquele cafezinho acompanhado de tapioca, era mais que necessário para iniciar mais um dia de trabalho. Fomos embora do Acre, mas ficaram lembranças e amigos. Voltar ao Acre, sempre será motivo de alegria para mim, tenho certeza que ainda tem muito a pesquisar.

Aos meus colegas de bancada do grupo de Flebotomíneos: Flavia Benini, Vicente Machado, Thais Goulart e Wanderson Oliveira, obrigado pelo apoio durante a realização de cada um dos ensaios, nada disto teria sido possível sem a ajuda de vocês; agradeço especialmente o Vicente e a Flavia pelas sugestões durante a escrita desta tese. Gostaria de agradecer também aos IC: Fernanda, Amanda e Thayna.

Gostaria de agradecer também a todos os membros do Grupo de Triatomíneos e Tripanossomatídeos, Jader de Oliveira, Thiago Belintani, Lucas Abrantes, Heloisa Pinotti Eder Souza, Leticia Moreno e em especial a Juliana Damieli e Rossana Falcone, sou imensamente grato pela ajuda, pelas nossas conversas e por cada um dos nossos momentos dentro e fora do laboratório.

Ao pessoal do Laboratório de Epidemiologia da Saúde Pública – USP, Carole, Cecilia, Fredy, Marcia, Mariana, Priscila e Vanessa; a todos eles muito obrigado pela oportunidade de compartilhar a bancada com vocês e pela gentileza e ajuda em todos os momentos.

Para Rodrigo Contreras pela amizade, por permitir a realização das coletas de parte importante dos flebotômicos utilizados neste estudo no sítio familiar, que ele como bom naturalista cuida com paixão.

Para todos os moradores e amigos de Assis Brasil (Brasil) e Iñapari (Perú), cidades fronteiriças irmãs. Pessoal sempre prestativos, que abriram as portas das suas casas para as diferentes pesquisas que ali foram desenvolvidas, sou eternamente agradecido.

A Dona Magdalena (*in memoriam*), que mesmo não estando mais fisicamente conosco, está em nossos corações. Dona Magdalena você deixou um imenso legado de amor e carinho. Saudades com você faz sentido!

Agradeço a Celia, por ter me acolhido na casa dela por um longo tempo, foi sem dúvida, uns dos períodos mais agradáveis da minha vida no Brasil. A nossa convivência com o passar do tempo transformou-se em uma amizade maravilhosa. Sou grato também pelas nossas conversas, que me fizeram refletir e mudar muitas vezes a minha maneira de enxergar o mundo, fazendo de mim uma pessoa melhor. Fico feliz em ter conhecido três grandes companheiros, o teimoso Napoleão, a Kalu minha gordinha maravilhosa e a Kika, sempre com alguma coisa por dizer.

Para Sr. Mario, Patricia, Alexandre, Vinicius, Pollyanna e William pelos gratos momentos que juntos compartilhamos. Cada momento ficará eternamente guardado na minha memória; vocês fizeram de cada encontro uma festa.

A minha esposa Liz Galiano (Liso), pelo amor, pela paciência, encorajamento e apoio permanente nesta jornada. Obrigado por me acompanhar durante estes dois últimos anos de doutorado, período em que você veio para Araraquara e ficou do meu lado, sem se importar com as dificuldades. Obrigado por me fazer companhia e pela oportunidade de compartilharmos agradáveis momentos.

Agradeço a minha família: a minha mãe Silvia Ortiz e seu esposo Carlos Orbezo por sempre me motivar a seguir em frente; por todo o amor e os anos que compartilharmos. Pela luta diária e constante que tivemos que viver; cada dia um constante recomeço, obrigado mãe.

Ao meu pai Conrado Samillan, pelos conselhos, apoio, confiança e amor. Aos meus irmãos Sylvia Mercedes, Josefa Candy, Conrado e Luciana, por acreditar em mim e manter sempre contato. A minha avó paterna Josefa (Chepita), e as minhas tias, Soledad e Mercedes, obrigado por cada palavra para continuar em frente. Avó, mesmo que você não fale mais, as lembranças que eu guardo de você falam mais alto.

RESUMO

Os flebotomíneos são vetores importantes do protozoário *Leishmania*, agente etiológico das leishmanioses, da bactéria *Bartonella bacilliformis*, agente etiológico da doença de Carrion e de algumas arboviroses. Dada a relevância epidemiológica dos flebotomíneos na transmissão das leishmanioses, diferentes áreas de estudo da biologia desses insetos são necessárias, como por exemplo, métodos de criação apropriados para cada espécie, interação parasita-vetor, competência e capacidade vetorial, e ecologia química. Este trabalho avaliou dois aspectos da ecologia química de flebotomíneos. No primeiro capítulo, foi avaliada a atratividade de duas iscas comerciais desenvolvidas a partir de voláteis emanados por seres humanos para a captura de flebotomíneos em campo. No segundo capítulo, foi investigada a presença ou indicação de feromônios sexuais e de oviposição em quatro espécies de flebotomíneos. Nas capturas com as iscas comerciais, as espécies que apresentaram maior abundância durante o período de coleta foram: *Pintomyia nevesi*, *Nyssomyia whitmani*, e *Nyssomyia antunesi*. As análises estatísticas realizadas pelo Modelo Linear Generalizado Misto (MLGM) indicaram que apenas para *Ny. whitmani* foi detectada uma ligeira indicação de atratividade para a armadilha luminosa iscada com o atrativo BGL ($p=0,0497$); para *Ny. antunesi* e *Pi. nevesi* não houve indicação de atratividade em comparação com a armadilha controle de luz. Com relação aos feromônios, com a utilização da técnica de Microextração em Fase Sólida seguida de Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrofotometria de Massa (SPME-CG/MS), foi possível a extração e identificação *in vivo* do feromônio sexual em machos de *Lu. longipalpis* observando-se diferenças nos padrões de liberação e conteúdo total deste feromônio (9-Metilgermacreno-B) entre indivíduos da mesma idade. Em machos provenientes de campo de *Migonemyia migonei* detectou-se um composto desconhecido (MM=218), que apresentou 76% de similaridade com germacrona (composto utilizado em laboratório para a síntese do feromônio de *Lu. longipalpis*). Em machos das espécies *Ny. whitmani* e *Ny. neivai*, não foi possível identificar nenhum composto volátil que pudesse agir como feromônio. Em fêmeas e ovos das espécies de *Ny. whitmani*, *Pi. fischeri* e *Mg. migonei* foi identificada a presença do ácido dodecanóico, feromônio de oviposição em *Lu. longipalpis*. Além do ácido dodecanóico, alguns aldeídos, como o nonanal, foram identificados em todas as espécies. Para *Ny. neivai* apenas traços de ácido dodecanóico foram detectados. Apenas para *Ny. neivai* foi possível a realização de bioensaios comportamentais para a oviposição. Nestes ensaios, as fêmeas grávidas dessa espécie não foram atraídas significativamente para o ácido dodecanóico. Mais investigações avaliando quais compostos, presentes na transpiração ou respiração de seres humanos, podem atuar como cairomônios para os flebotomíneos, assim como a função biológica do ácido dodecanóico e nonanal como possíveis atrativos ou estimulantes da oviposição nas espécies avaliadas podem ser alvos para novos estudos. Em machos de *Mg. migonei* o possível papel de um composto desconhecido, deve ser avaliado através de estudos de atratividade para fêmeas coespecíficas.

Palavras-chaves: flebotomíneos; cairomônios, feromônios, microextração em fase sólida; ácido dodecanóico 9-metilgermacreno-B, Modelo Linear Generalizado Misto.

ABSTRACT

Phlebotomine sand flies are important vectors of the protozoan *Leishmania*, the causative agent of leishmaniasis, of the bacterium *Bartonella bacilliformis*, etiologic agent of Carrion disease and some arboviruses. Due to the epidemiological relevance of phlebotomines in the transmission of leishmaniasis, different study areas of the biology of these insects are necessary, such as breeding methods specific for each species, vector-parasite interaction, vector competence, vectorial capacity, and chemical ecology. Two aspects of the chemical ecology of sand flies were evaluated in this work. In the first chapter, the attractiveness of two commercial baits developed from volatiles emanated by humans for the capture of sandflies in the field was evaluated. In the second chapter, the presence or indication of sex and oviposition pheromones in four species of sand flies was investigated. In catches with commercial baits, the species which presented the greatest abundance during the collection period were: *Pintomyia nevesi*, *Nyssomyia whitmani* and *Nyssomyia antunesi*. The statistical analyzes performed by the Generalized Linear Mixed Model (GLMM) indicated that only for *Ny. whitmani* a slight indication of attractiveness was detected for the light trap baited with attractive BG-Lure ($p = 0.0497$); for *Ny. antunesi* and *Pi. nevesi* there was no indication of attractiveness compared with the light control traps. In relation to the pheromones, using the Solid Phase Microextraction technique followed by Gas Chromatography coupled to Mass Spectrophotometry (SPME-CG/MS), it was possible the extraction and identification *in vivo* of the sexual pheromone in *Lu. longipalpis* males (9-Methyl-germacrene-B); it was also detected differences in pheromone release patterns and variation in pheromone content among individuals of the same age. In wild males of *Mg. migonei*, an unknown compound (MM=218) was found, which presented 76% similarity with germacrone (used in laboratory for the synthesis of the sex pheromone, 9-Methyl-germacrene-B, in *Lu. longipalpis*). It was not possible to identify volatile compounds that could act as sex pheromone in males of the species *Ny. whitmani* and *Ny. neivai*. In gravid females and eggs of *Ny. whitmani*, *Pi. fischeri* and *Mg. migonei*, the presence of dodecanoic acid, the oviposition pheromone in *Lu. longipalpis* was identified. In addition to dodecanoic acid, some aldehydes, such as nonanal, were detected in all species. For *Ny. neivai*, only traces of dodecanoic acid were detected. It was possible to conduct behavioral bioassays only for *Ny. neivai*. In these assays, pregnant females of this species were not significantly attracted to dodecanoic acid. Further research to evaluate which compounds, present in transpiration or humans' respiration, can act as kairomones for surveillance of phlebotomine sand flies, as well as the biological function of dodecanoic acid and nonanal as possible attractants or stimulants of oviposition in the species evaluated can be targets for further studies. In *Mg. migonei*, the possible role of the unknown compound detected in males should be evaluated through studies of attractiveness to co-specific females.

Key-words: Sand Flies; Kairomones, pheromones, Solid phase micro-extraction; dodecanoic acid, 9-methyl-germacrene-B, Mixed Generalized Linear Model.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Figura 1.** **A.** Mapa das áreas de coleta de flebotomíneos em Assis Brasil, Acre (círculo amarelo), **B.** Vista aérea das localidades em Assis Brasil; área 1 (bandeira azul) e área 2 (bandeira vermelha), **C.** Local de coleta na área 1 (W1), **D.** Locais de coleta na área 2 (P1, peridomicílio, W2 e W3, floresta). Mapa elaborado com o software Qgis, imagens de Google Satellites. 37
- Figura 2.** Gráficos de mosaicos mostrando a abundância das 17 principais espécies de flebotomíneos capturadas para cada local de captura, Floresta 1 (W1), Floresta 2 (W2), Floresta 3 (W3) e Peridomicílio (P1). A largura das barras é proporcional ao número de indivíduos capturados para cada espécie. —○— = nenhum espécime capturado; ○— = nenhum macho capturado; —○ = nenhuma fêmea capturada. 41
- Figura 3.** Gráfico de mosaico mostrando a abundância das 17 principais espécies capturadas por tipo de atrativo utilizado: BG-Lure (BGL), BG-Sweetscents (BGS) e Luz (LL). A largura das barras é proporcional ao número de indivíduos capturados para cada espécie. 42
- Figura 4.** Diagrama de Venn para riqueza de espécies de flebotomíneos por tipo de atrativo, número e porcentagem das espécies comuns entre eles. 45
- Figura 5.** Nas análises de correspondência restrita das espécies capturadas explicadas pelo sexo. Os scores para cada local são calculados a partir das capturas ao longo das noites e os agrupamentos são apresentados em forma de polígonos para cada sexo. 46
- Figura 6.** Análises de correspondência canônica das espécies capturadas explicadas pelo atrativo. 47
- Figura 7.** Box-plots para abundância (escala log) de machos e fêmeas de *Pi. nevesi* (A), *Ny. whitmani* (B), *Ny. antunesi* (C) capturados por local e tipo de atrativo. Linha em negrito: mediana; Círculo aberto: valores extremos..... 52
- Figura 8.** Taxas de captura relativas de fêmeas versus machos para os locais W2, W3 e P1 com relação a W1, para *Pi. nevesi* (a), *Ny. whitmani* (b) *Ny. antunesi* (c), intervalo de confiança 95%. 53

CAPÍTULO 2

- Figura 1.** Dispositivo Manual SPME. Fonte: Pawliszyn, J. (2012)..... 69
- Figura 2.** Procedimento de coleta dos voláteis in vivo por headspace-SPME **A.** Extração dos analitos, **B.** Dessorção dos analitos: Fibra SPME inserida no injetor do

cromatógrafo gasoso para a dessorção dos compostos, C. Porta de injeção no cromatógrafo gasoso: local de inserção da fibra. Imagem ilustrativa, D. Cromatograma. Adaptado do Handbook of Solid Phase Microextraction. Pawliszyn, J. (2012).	70
Figura 3. A. Localização dos municípios de coleta de flebotomíneos no estado de São Paulo. B. Ponto 1 (-21.29294; -48.722118), no município de Fernando Prestes, SP.; local de coleta de <i>Nyssomyia whitmani</i> , <i>Pintomyia fischeri</i> e <i>Migonemyia migonei</i> , C. Ponto 2 (-21.612209; -47.879902) no município de Rincão, SP., local de coleta de <i>Nyssomyia neivai</i>	73
Figura 4. A. Armadilha luminosa tipo HP, instalada próxima a galinheiros e chiqueiros, B. Aspirador de Castro, para sucção dos insetos.	73
Figura 5. A. Gaiola Barraud para o transporte e criação dos flebotomíneos em laboratório. B. Recipientes plásticos para o armazenamento e criação das fases imaturas dos insetos.	75
Figura 6. Ilustração do processo de coleta dos voláteis sob aquecimento por HS-SPME-CG/MS. A. Pré-equilíbrio a diferentes temperaturas: 50, 70, 110, 130, 150 e 170° C; B. Extração dos analitos: Fibras SPME inseridas dentro de cada recipiente e expostas para a sorção dos voláteis a temperatura ambiente por 45 min; C. Dessorção térmica dos compostos na porta de injeção, cromatógrafo gasoso..	77
Figura 7. Padronização do processo de extração de compostos voláteis por aquecimento em machos da espécie <i>Lu. longipalpis</i> por Headspace – Microextração em fase sólida, seguido de cromatografia gasosa acoplada a espectrofotometria de massa (HS-SPME-CG/MS). □= condição ótima para a extração.	79
Figura 8. Fluxograma dos ensaios utilizados na avaliação dos compostos voláteis liberados em fêmeas grávidas e ovos de diferentes espécies de flebotomíneos.	80
Figura 9. Etapas do ensaio comportamental para investigação de feromônio de oviposição em <i>Nyssomyia neivai</i>	82
Figura 10. A. Coleta de voláteis in vivo por headspace durante a oviposição de fêmeas de <i>Ny. neivai</i> , B. Detalhe do headspace, com as fêmeas e ovos recém ovipostos nas paredes do recipiente.	84
Figura 11. Coleta de compostos da superfície de ovos de <i>Lu. longipalpis</i> . A. Vials (10 mL) com papel filtro umedecido e fêmeas grávidas para oviposição x 48 horas; B. Coleta de voláteis por contato direto com ovos.	85

Figura 12. Processo de coleta dos compostos liberados durante a oviposição de fêmeas de flebotomíneos; A. Fêmea liberando ovos em solução salina; B. Fibra SPME em contato com ovos liberados, próximo à parte distal do abdômen.....	86
Figura 13. Fluxograma dos ensaios para avaliação dos compostos voláteis liberados por machos de flebotomíneos..	87
Figura 14. Coleta de voláteis por HS-SPME in vivo, com a mesma fibra. A. Antes da cópula B. Durante a cópula. Procedimento realizado para as cinco espécies. (Foto: <i>Ny. neivai</i>)..	88
Figura 15. Processo de criação dos flebotomíneos em laboratório.....	90
Figura 16. B.O.D. para criação de insetos. Fotoperíodo 12:12 horas (claro/escuro), temperatura 25 ± 1 °C, umidade relativa: 80 ± 5 %.....	91
Figura 17. A. Cromatogramas obtidos por HS-SPME-GC-MS nas análises dos compostos voláteis de machos de <i>Lu. longipalpis</i> com as fibras SPME: DVB/CAR/PDMS 50/30µm; PDMS/DVB 85µm; CAR/PDMS 65µm e PA 85µm. B. Comparação das áreas totais dos picos 1, 2, e 3 obtidas por HS-SPME-CG/MS para os quatro diferentes revestimentos das fibras SPME. C. Áreas totais obtidas por HS-SPME/CGMS dos picos 1, 2, e 3 com a fibra DVB/CAR/PDMS, quando submetidas às amostras a diferentes temperaturas de pré-equilíbrio.	94
Figura 18. Atratividade de ovos coespecíficos em fêmeas grávidas de <i>Ny. neivai</i> , realizada em setembro (n=10) (1) Posturas realizadas sobre os quadrantes teste e controle; (2) Posturas realizadas sobre as cavidades tampadas dos quadrantes teste e controle..	97
Figura 19. Atratividade de ovos coespecíficos para fêmeas grávidas de <i>Ny. neivai</i> – coletas de setembro e dezembro (n=26) (1) Posturas realizadas sobre os quadrantes teste e controle; (2) Postura realizadas sobre as cavidades tampadas dos quadrantes testes e controle. Letras iguais indicam que não houve diferença estatística entre os tratamentos ($p > 0,05$).	97
Figura 20. Atratividade do ácido dodecanóico (120 ng) para fêmeas grávidas de <i>Ny. neivai</i> , (1) Posturas realizadas sobre os quadrantes teste e controle; (2) Postura realizadas sobre as cavidades tampadas dos quadrantes testes e controle. Letras iguais indicam que não houve diferença estatística entre os tratamentos ($p > 0,05$).	98
Figura 21. Atratividade do ácido dodecanóico para fêmeas grávidas de <i>Ny. neivai</i> ; avaliando a oviposição em quadrantes testes com diferentes volumes do composto (1). 1,2 µL (equivalente a 120 ng de ácido dodecanóico); (2). 1,5 µL (150ng) e (3). 2,4 µL	

(240 ng) frente aos quadrantes controles. Letras iguais indicam que não diferem estatisticamente entre si ($p>0,05$).	99
Figura 22. Cromatograma obtido por GC-MS resultante da extração dos compostos voláteis de fêmeas de <i>Pi. fischeri</i> , obtidos por HS-SPME-CG/MS. Fibra utilizada DVB/CAR/PDMS (cinza). Os números dos picos correspondem à tabela 7.	101
Figura 23. Diferenças entre as áreas totais dos isômeros do feromônio sexual de <i>Lu. longipalpis</i> para machos virgens com cinco dias após emergência, avaliados individualmente in vivo por HS-SPME-CG/MS.	105
Figura 24. Diferenças entre as áreas totais dos três isômeros do feromônio sexual de <i>Lu. longipalpis</i> para machos virgens com cinco dias após emergência (apenas minutos de diferença), avaliados individualmente por HS-SPME-CG/MS sob aquecimento, 170° C x 45min.	106

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Abundância das espécies de flebotomíneos coletadas em quatro locais diferentes com armadilha luminosa sem atrativo (L), BgLure (BGL)+L e Sweetscent (BGS)+L; coletadas entre 16 Setembro e 03 Outubro 2016 em Assis Brasil, Acre, Brasil.....	43
Tabela 2. Abundância das espécies de flebotomíneos por sexo (M=macho e F=fêmea) e tipo.....	44
Tabela 3. Critérios de Informação de Akaike (AIC) e Informação Bayesiano de Schwarz (BIC), para cada um dos modelos estudados para a avaliação das capturas de <i>Pi. nevesi</i> , <i>Ny. antunesi</i> e <i>Ny. whitmani</i> . * Indica o modelo final. Fonte: Próprio autor. 49	49
Tabela 4. Média aritmética ajustada pelo GLMM para as capturas das três espécies mais abundantes coletadas entre 16 de setembro e 03 de outubro de 2016 em Assis Brasil, Acre, Brasil.....	50
Tabela 5. Análise dos fatores de efeito fixo influenciando na distribuição do número de indivíduos capturados em três espécies de flebotomíneos em Assis Brasil, Acre. Análises usando o Modelo Linear Generalizado Misto com função de ligação log as distribuições Poisson (<i>Pi. nevesi</i>) e Binomial negativo (<i>Ny. whitmani</i> e <i>Ny. antunesi</i>). 51	51

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Resumo das estruturas, compostos e evidência comportamental de feromônio sexual em machos de flebotomíneos.	62
Tabela 2. Resumo dos feromônios, cairomônios e substratos que atuam como atrativos ou estimulantes da oviposição em flebotomíneos.	67
Tabela 3. Fibras SPME, segundo tipo de revestimento, polaridade e sorção.	70
Tabela 4. Condições de criação das espécies de flebotomíneos. R1: Ração de peixe, ração de coelho, fezes de coelho e terra vegetal (1:1:1:1) (Goulart et al. 2017); R2: fígado bovino liofilizado, terra vegetal (1:1) (Ribeiro et al. 2015); S1: Sala de criação, temperatura: 28±2° C / B.O.D.: Incubadora B.O.D., temperatura 25±1. Ciclo gonotrófico estimado apenas para F1.	92
Tabela 5. Número de insetos e volumes de recipientes amostrados, para a detecção in vivo de voláteis em machos, fêmeas e casais de <i>Lutzomyia longipalpis</i> (9-metil-germacreno-B). Pico 1,2 e 3 são isômeros do 9-metil-germacreno-B.	95

Tabela 6. Número de ovos de <i>Lutzomyia longipalpis</i> e <i>Nyssomyia neivai</i> depositados em recipientes de 10 e 1,5 mL. Extração e detecção de compostos voláteis por aquecimento através do HS-SPME-GC/MS em ovos de até 48 horas de idade e fêmeas após oviposição.	101
Tabela 7. Compostos identificados em fêmeas e ovos de flebotomíneos por headspace-SPME-CG/MS, 170° C x 45 min. e ovos por contato direto-SPME-CG/MS: (a) após 48 horas; (b) recém-expulsos, para <i>Lu. longipalpis</i> , <i>Ny. neivai</i> , <i>Pintomyia fischeri</i> , <i>Ny whitmani</i> e <i>Mg. migonei</i> ; organizados pelo índice de retenção (IR). (+) compostos detectados; (-) compostos não detectados, (*) traços de compostos.	103
Tabela 8. Resumo dos compostos identificados por Headspace- SPME-CG/MS a temperatura ambiente e por aquecimento; em machos de <i>Lutzomyia longipalpis</i> , <i>Nyssomyia neivai</i> , <i>Nyssomyia whitmani</i> , <i>Pintomyia fischeri</i> e <i>Migonemyia migonei</i> . (+) compostos detectados; (-) compostos não detectados.* Ensaio realizado com insetos de campo.	107

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	21
1.1. FLEBOTOMÍNEOS	21
1.2. LEISHMANIOSES	24
1.3. LEISHMANIOSES NO BRASIL	25
1.4. ECOLOGIA QUÍMICA.....	26
1.4.1. ECOLOGIA QUÍMICA EM FLEBOTOMÍNEOS	27
2. JUSTIFICATIVA	30
3. OBJETIVOS.....	31
3.1. OBJETIVO GERAL	31
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
RESUMO	32
ABSTRACT	33
1. INTRODUÇÃO.....	34
2. OBJETIVO.....	36
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	36
3.1. LOCAL DE ESTUDO.....	36
3.2. DESENHO DO ESTUDO	36
3.3. COLETA E IDENTIFICAÇÃO DE FLEBOTOMÍNEOS	38
3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA	39
3.4.1. ORDENAÇÃO DE ESPÉCIES	39
3.4.2. ANÁLISES DAS TRÊS ESPÉCIES COM AS MAIORES ABUNDÂNCIAS E IMPORTÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA	39
4. RESULTADOS.....	40
4.1. IDENTIFICAÇÃO DOS FLEBOTOMÍNEOS	40
4.2. ORDENAÇÃO DAS ESPÉCIES	45
4.3. ANÁLISES DAS TRÊS ESPÉCIES COM MAIOR ABUNDÂNCIA.....	47
5. DISCUSSÃO	54
6. CONCLUSÕES.....	56
RESUMO	57
ABSTRACT	58
1. INTRODUÇÃO.....	59
1.1. FEROMÔNIOS SEXUAIS EM FLEBOTOMÍNEOS	59
1.2. FEROMÔNIO DE OVIPOSIÇÃO EM FLEBOTOMÍNEOS	65
1.3. DETECÇÃO DE VOLÁTEIS.....	68
1.3.1. MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA)	68
2. OBJETIVOS.....	71
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	72
3.1. COLETA EM CAMPO: ÁREAS DE COLETA DE FLEBOTOMÍNEOS	72
3.2. MANUTENÇÃO DE FLEBOTOMÍNEOS EM LABORATÓRIO.....	74
3.3. PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE HEADSPACE - MICRO EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA SEGUIDA DE CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROFOTOMETRIA DE MASSA (HS-SPME-CG/MS).....	75

3.3.1. SELEÇÃO DAS FIBRAS, TEMPERATURA DE PRÉ-EQUILÍBRIO E TEMPO DE EXTRAÇÃO.....	75
3.3.2. ANÁLISE POR GC/MS	77
3.3.3. BIBLIOTECAS DE REFERÊNCIA E PADRÕES COMERCIAIS	78
3.4. AVALIAÇÃO DE FEROMÔNIOS DE OVIPOSIÇÃO	80
3.5. ENSAIO COMPORTAMENTAL PARA DETERMINAÇÃO DE FEROMÔNIOS DE OVIPOSIÇÃO EM <i>NYSSOMYIA NEIVAI</i>	81
3.5.1. ALIMENTAÇÃO DE FÊMEAS E ACASALAMENTO.....	81
3.5.2. ATRATIVIDADE DE FÊMEAS GRÁVIDAS DE <i>Ny. neivai</i> PARA OVOS COESPECÍFICOS	81
3.5.3. AVALIAÇÃO DA ATRATIVIDADE DO ÁCIDO DODECANÓICO EM FÊMEAS GRÁVIDAS DE <i>Ny. neivai</i>	82
3.5.4. EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS POR MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA EM HEADSPACE DURANTE A OVIPOSIÇÃO E POSTERIOR DETERMINAÇÃO CROMATOGRÁFICA (HS-SPME-CG/MS).....	83
3.5.5. EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS POR CONTATO – SPME E POSTERIOR CROMATOGRÁFICA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROFOTOMETRIA DE MASSA.	84
3.6. EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS POR MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA EM HEADSPACE DURANTE O COMPORTAMENTO DE COORTE E ACASALAMENTO E POSTERIOR DETERMINAÇÃO CROMATOGRÁFICA (HS-SPME-CG/MS).....	88
4. RESULTADOS.....	89
4.1. COLETA EM CAMPO	89
4.2. MANUTENÇÃO DE FLEBOTOMÍNEOS EM LABORATÓRIO.....	89
4.3. PADRONIZAÇÃO DE CRIAÇÃO.....	89
4.3.1. ESTABELECIMENTO DE COLÔNIA DE <i>Lutzomyia longipalpis</i>	89
4.3.2. ESTABELECIMENTO DE COLÔNIAS DE <i>Ny. whitmani</i> , <i>Pi. fisheri</i> <i>Mg. migonei</i>	91
4.4. PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE HEADSPACE - MICRO EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA SEGUIDA DE CROMATOGRÁFICA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROFOTOMETRIA DE MASSA (HS-SPME-CG/MS).....	93
4.4.1. SELEÇÃO DE FIBRAS, TEMPERATURA DE PRÉ-EQUILÍBRIO E TEMPO DE EXTRAÇÃO.....	93
4.5. BIOENSAIO PARA DETERMINAÇÃO DE FEROMÔNIO DE OVIPOSIÇÃO	96
4.5.1. ATRATIVIDADE DE FÊMEAS DE <i>Ny. neivai</i> A OVOS COESPECÍFICOS	96
4.5.2. AVALIAÇÃO DA ATRATIVIDADE DO ÁCIDO DODECANÓICO EM FÊMEAS GRÁVIDAS DE <i>Ny. neivai</i>	98
4.6. MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPME) PARA DETERMINAÇÃO DE FEROMÔNIO DE OVIPOSIÇÃO	100
4.6.1. EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS POR MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA EM HEADSPACE DURANTE A OVIPOSIÇÃO E POSTERIOR DETERMINAÇÃO CROMATOGRÁFICA (HS-SPME-CG/MS).....	100
4.6.2. EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS POR MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA POR CONTATO EM OVOS E POSTERIOR DETERMINAÇÃO CROMATOGRÁFICA (CONTATO-SPME-CG/MS).....	102
4.7. EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS POR MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA EM HEADSPACE DURANTE O COMPORTAMENTO DE CORTE E ACASALAMENTO E POSTERIOR DETERMINAÇÃO CROMATOGRÁFICA (HS-SPME-CG/MS).....	104
5. DISCUSSÃO	108
6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS DE FUTUROS ESTUDOS	114
REFERÊNCIAS	115
APÊNDICE	137

APÊNDICE 1.1.....	137
APÊNDICE 1.2.....	140
APÊNDICE 2. 1.....	150
APÊNDICE 2. 2.....	151
APÊNDICE 2. 3.....	152
APÊNDICE 2. 4.....	157
APÊNDICE 2. 5.....	158
APÊNDICE 2. 6.....	159
ANEXOS	160
ANEXO 1. COMITÊ DE ÉTICA.....	160
ANEXO 2. DECLARAÇÃO DE DIREITOS AUTORAIS.....	161

1. INTRODUÇÃO

1.1. FLEBOTOMÍNEOS

Os flebotomíneos pertencem à ordem Diptera, subordem Nematocera, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae. Das 1000 espécies de flebotomíneos reconhecidas no mundo, 530 espécies ocorrem nas Américas, sendo 20 destas consideradas prováveis vetores de pelo menos 18 espécies de *Leishmania* para o ser humano (Brazil et al. 2015, Shimabukuro et al. 2017, Steverding 2017). Os flebotomíneos também são responsáveis pela transmissão de outros patógenos como a bactéria *Bartonella bacilliformis*, agente etiológico da doença de Carrion (Bartonelese) e alguns arbovirus (Ready 2013, Bates et al. 2015a).

São insetos holometábolos com quatro fases de vida: ovo, larva (quatro estádios), pupa e adulto; a duração do ciclo de vida varia dependendo das condições ambientais e das espécies, sendo em média de 30 a 45 dias (Alexander 2000). Os adultos são suscetíveis à dessecação, o que os torna mais ativos durante o período noturno e crepuscular (Killick-Kendrick 1999, Claborn 2010), embora algumas espécies possuam o hábito de picar durante o dia (Wilkes et al. 1984). Estes insetos popularmente recebem mais de um nome no Brasil, dependendo da localização geográfica: mosquito-palha, tatuquira, birigui, cangalhinha, asa-dura, asa branca, anjinho, flebótomo, catuqui, entre outros (Rebêlo 1999, Ministério da Saúde 2017b).

Os flebotomíneos são pequenos, com pouco mais de 3 mm de comprimento, corpo revestido de cerdas, de cor clara ou amarelada, às vezes quase preto e quando em repouso as asas ficam em posição ereta, posicionadas em forma de “V”(Forattini 1973). Machos e fêmeas alimentam-se de açúcares provenientes da seiva das plantas, nectar de flores, frutos e secreções de afídeos e somente as fêmeas são hematófagas (Young and Duncan 1994, Cameron et al. 1995b, Killick-Kendrick 1999).

Em algumas espécies de flebotomíneos como *Lutzomyia longipalpis*, os machos formam agregados ou leques por cima dos hospedeiros, liberando feromônios que exercem atração para ambos os sexos; atraindo um maior número de machos (agregação), como de fêmeas para o local (sexual) (Ward et al. 1989). Em machos de *Lu. longipalpis* foram identificados até o momento cinco feromônios sexuais em diferentes populações dessa espécie, 9-methyl-germacrene-B, 3-methyl- α -himachaleno, Cembreno-1, Cembreno-2 e 9-methyl-germacrene-B⁺ (Hamilton et al., 2005, 2008).

Fêmeas grávidas (acasaladas e engurgitadas) procuram locais quentes, úmidos e protegidos do sol, ricos em matéria orgânica; alguns desses criadouros foram localizados em tocas de animais, buracos em troncos de árvores e no solo próximos às raízes, fendas de pedra ou cavernas (Ferreira et al. 1938, Coutinho and Barretto 1941, Hanson 1961, Rutledge and Mosser 1972, Forattini 1973, Peterkova-Koci et al. 2012).

O tempo desde a ingestão de sangue até a oviposição (ciclo gonadotrófico) pode variar entre 3 a 7 dias, dependendo das condições de temperatura e da espécie, como por exemplo, 3 a 6 dias em *Lu. Longipalpis* (Milleron et al. 2008), 3 a 4 dias para *Nyssomyia neivai* (Casanova et al. 2009), nove dias para *Lu. (Nyssomyia) trapidoi*, (Chanotis 1986). Em *Lu. longipalpis*, após este período as fêmeas depositam seus ovos, fixando-os ao substrato através de uma substância produzida pelas glândulas acessórias a partir dos ácidos graxos obtidos do sangue. Esta substância, identificada como ácido dodecanóico protege os ovos da dessecação, atrai e estimula a oviposição de novas fêmeas grávidas (Dougherty and Hamilton 1997).

Os ovos têm formato oval e medem aproximadamente 0,3 a 0,5 mm de comprimento. Quando recém-depositados apresentam uma coloração esbranquiçada, tornando-se marrom escuro após poucas horas; as larvas eclodem entre o 7º ao 10º dia após a oviposição dependendo da espécie e das condições ambientais. As larvas apresentam quatro estádios (L1 a L4) sendo a diferença entre elas no tamanho e no número de cerdas caudais, apresentando um par de cerdas em L1, e dois pares a partir de L2. As larvas são pequenas, brancas ou amareladas; apresentam aparelho bucal do tipo mastigador, alimentando-se vorazmente de matéria orgânica, das cascas dos ovos eclodidos, de adultos mortos, de fungos e na falta de alimento praticam o canibalismo. A pupa evolui a partir do último estágio larval (L4) permanecendo imóvel e sem se alimentar. Inicialmente, a pupa é esbranquiçada tornando-se amarelada, marrom e finalmente negra; nessa fase o inseto adulto está pronto para emergir (Killick-Kendrick 1999, Rangel et al., 2018).

Como indicado anteriormente, machos e fêmeas alimentam-se de diversos açúcares; além dos açúcares, as fêmeas precisam de um repasto sanguíneo prévio para desenvolver o ciclo gonadotrófico, estas espécies são chamadas de anautógenas (Young and Duncan 1994). As fêmeas obtêm do sangue, os lipídeos e proteínas que são necessários para o amadurecimento do aparelho reprodutor e a produção de ovos (Ready 1979). Em *Lu. intermedia* a ingestão de sangue contribui para o aumento da longevidade das fêmeas (Rangel et al. 1986). Mas a ingestão de sangue antes da

primeira oviposição não é uma regra absoluta, algumas espécies, chamadas de autógenas, conseguem ovipor sem prévia ingestão de sangue: *Phlebotomus papatasi*, *Phlebotomus mascittii*, *Lutzomyia lichyi*, *Lutzomyia gomezi*, *Lutzomyia cruciata*, *Lutzomyia shannoni* e *Lutzomyia evansi* (Magnarelli et al. 1984, Montoya-Lerma 1992, Young and Duncan 1994, Castillo et al. 2015); essas espécies armazenam os nutrientes necessários para a oviposição a partir dos nutrientes obtidos durante as fases larvais (Bentley and Day 1989).

Os insetos hematófagos geralmente se alimentam de uma ampla variedade de hospedeiros vertebrados (insetos generalistas ou ecléticos); a população de *Lu. longipalpis* de Marajó no Pará não apresentou preferência alimentar entre frango, cão e homem (Quinnell et al. 1992); no Paraná *Nyssomyia whitmani*, *Nyssomyia neivai* e *Pintomyia fischeri* foram atraídos igualmente para cão, porco, galinha e coelho (Muniz et al. 2006, Dias-Sversutti et al. 2007). Porém há espécies que apresentam uma maior especificidade alimentar como, por exemplo, *Lu. (Bichromomyia) flaviscutellata*, apresenta maior preferência para roedores do que para o homem (Lainson and Shaw 1968); *Lu. (Dampfomyia) vespertilionis*, com preferência para morcegos e *Lu. (Micropygomyia) trinidadensis*, com preferência para lagartos (Young and Duncan 1994). Insetos hematófagos ecléticos seriam peças chaves na manutenção do ciclo de transmissão zoonótico (Montoya-Lerma and Lane 1996).

Mesmo considerando as diferentes metodologias utilizadas para avaliar a preferência alimentar dos flebotomíneos, infere-se que o hábito alimentar está relacionado com a disponibilidade espacial e temporal dos hospedeiros, ao valor nutricional da fonte sanguínea, ao comportamento defensivo dos hospedeiros, às condições ambientais e à resposta imune dos hospedeiros frente à saliva dos insetos entre outros (Lyimo and Ferguson 2009). Além dessas características, o inseto hematófago deve ter a capacidade de identificar, localizar e responder aos diferentes estímulos visuais e compostos químicos voláteis emanados pelos diferentes hospedeiros (Lehane 1991).

Nos insetos hematófagos, três das atividades são as mais importantes: a busca por um hospedeiro, a procura de um potencial parceiro e a localização de um local em ótimas condições de temperatura, umidade relativa e alimento para a prole; estas atividades dependem diretamente da capacidade de olfato e visão dos insetos e estão interligadas à ingestão de sangue, momento no qual, podem adquirir a infecção através da ingestão de amastigotas de *Leishmania* spp. (Bentley and Day 1989, Claborn 2010).

1.2. LEISHMANIOSES

As leishmanioses compreendem um conjunto de doenças causadas por protozoários parasitos do gênero *Leishmania* (Trypanosomatida: Trypanosomatidae) que são transmitidos através da picada de fêmeas infectadas de flebotomíneos. As fêmeas destes insetos ficam infectadas quando se alimentam de animais reservatórios selvagens parasitados. Em um segundo repasto sanguíneo, elas são capazes de transmitir o parasita a outros animais selvagens ou domésticos ou ao ser humano (Desjeux 1996). Existem 1000 espécies de flebotomíneos identificadas no mundo, e pouco mais da metade (530 espécies) são encontradas nas Américas (Shimabukuro et al. 2017). Aproximadamente 78 espécies de flebotomíneos são incriminados como prováveis vetores de algumas das 53 espécies de *Leishmania* conhecidas, 31 espécies parasitam mamíferos e 20 são conhecidas por causarem doenças em humanos. Estas espécies causam diferentes tipos de manifestações clínicas, dependendo da resposta imune do hospedeiro e a virulência da espécie de *Leishmania* (Pearson and Sousa 1996, Akhoundi et al. 2016).

As leishmanioses estão distribuídas amplamente no globo; são endêmicas em 98 países, afetando principalmente pessoas de países pobres e estão associadas à desnutrição, migração, mudança climática, desmatamento e carência de recursos econômicos. Apresentam-se nas formas de leishmaniose visceral e tegumentar, que por sua vez apresenta-se como cutânea, mucocutânea e difusa. A Leishmaniose cutânea (LC), caracterizada por lesões ulcerativas na pele no local da picada dos flebotomíneos. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima 0,6 a 1 milhão de novos casos de LC por ano. Seis países, Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Irã, Síria foram responsáveis por 90% dos casos notificados em 2015 (WHO 2018). A forma mucocutânea (LM), é a mais desfigurante, causando destruição das cavidades naso-orais e faringe (Desjeux 2004); 90% dos casos mundiais da LM ocorrem na Bolívia, Brasil, Etiópia e Peru. Nas Américas as formas cutânea e mucocutânea são endêmicas em 18 países, com mais de 52 mil casos; sendo Brasil (25,9%), Colômbia (22,4%), Nicarágua (11,1%) e Peru (14,9%) os países com a maior porcentagem dos casos de LC e LM na região (OPAS 2018). A leishmaniose difusa é mais rara e apresenta-se ligada a problemas imunológicos.

A forma visceral (VL) ou "kala azar", é a forma mais severa, quando não tratada; caracterizada por febre, esplenomegalia, hepatomegalia, anemia e linfadenopatias (Desjeux 1996). Estima-se 50 a 90 mil casos de LV por ano sendo Brasil, Etiópia, Índia,

Quênia, Somália, Sudão do Sul e Sudão responsáveis por 90% dos casos notificados no ano de 2015 (WHO 2018). Nas Américas a LV é endêmica em 12 países, 95,4% destes casos ocorrem no Brasil (OPAS 2018).

1.3. LEISHMANIOSES NO BRASIL

No Brasil, desde as últimas décadas, tanto a leishmaniose tegumentar quanto a leishmaniose visceral, estão em contínuo processo de expansão. Até a presente data a LT apresenta casos em todos os estados do país. Esta forma da doença inicialmente zoonótica, que acometia pessoas que adentravam a floresta, passou a constituir um sério problema nas zonas rurais resultado do desmatamento, da construção de estradas, atividade agropecuária, ecoturismo e da extração de madeira; atualmente este padrão continua a expandir para regiões peri-urbanas das cidades (Ministério da Saúde 2017a).

São sete espécies de *Leishmania* identificadas como causadoras de LT em humanos: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) shawi*, *L. (V.) lindenberg* (Ministério da Saúde 2017a). Destas espécies a *L. (V.) braziliensis* é o principal agente etiológico identificado em casos autóctones no estado de São Paulo, *Ny. neivai*, *Ny. whitmani*, *Ny. intermedia*, *Mg. migonei*, *Pi. pessoai* e *Pi. fischeri* são os seis principais vetores incriminados ou suspeitos do estado (Shimabukuro et al. 2010).

O estado do Acre tem uma incidência 13 vezes maior (130 casos/100.000 habitantes) de LT do que a média nacional (10 casos /100.000 habitantes). O estado apresenta quatro principais agentes etiológicos: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) lainsoni* e as principais espécies vetorais envolvidas na transmissão da LT no estado são: *Ny. whitmani*, *Ny. antunesi*, *Ny. umbratilis*, *Ny. anduzei*, *Mg. migonei*, *Bichromomyia flaviscutellata*, *Pi. davis* e *Psychodopygus hirsutus hirsutus* (Ministério da Saúde 2017a).

A Leishmaniose visceral, própria de ambientes rurais, tem se espalhado para as zonas urbanas, isto graças à capacidade de adaptação e dispersão do seu principal vetor, *Lu. longipalpis* (Lainson and Rangel 2005, Rangel and Vilela 2008, Brazil 2013). Atualmente, a LV encontra-se distribuída em 21 dos 27 estados brasileiros (26 Estados + DF) e 1600 municípios (Ministério da Saúde 2017b). São duas as espécies de flebotomíneos no Brasil, envolvidas na transmissão de *L. (L.) infantum*; *Lu. longipalpis* principal vetor em 25 estados brasileiros e *Lu. cruzi* (Santos et al. 1998), restrita ao Mato Grosso do Sul. Além destas duas espécies, *Pintomyia evansi* tem sido incriminada

na Colômbia (Travi et al. 1994) e Venezuela (Felicangeli et al. 1999). A transmissão acontece quando fêmeas picam animais reservatórios urbanos como o cão ou silvestres como a raposa *Dusycion vetulus* e alguns marsupiais do gênero *Didelphis* (Ministério da Saúde 2017b).

1.4. ECOLOGIA QUIMICA

Os insetos estabelecem uma série de relações com indivíduos da mesma ou de outras espécies, e com seu entorno, por meio do sistema gustativo e olfativo, o que constitui uma das características mais importantes e ancestrais dos insetos, permitindo-lhe detectar e discriminar diferentes sinais químicos com um alto grau de sensibilidade (Greenfield 2002). Esses sinais são importantes para a transmissão de informações entre os indivíduos e para uma ampla variedade de funções e interações como: alimentação, agregação, reprodução, oviposição e defesa (Whittaker and Feeny 1971, Reinhard 2004).

Os mediadores químicos da comunicação são chamados de semioquímicos e são classificados segundo o tipo de comportamento que eles mediam e a relação dos organismos envolvidos (Agelopoulos and Wadhams 2000). Os feromônios são secretados ao ambiente por um indivíduo (organismo liberador) e recebidos por outro (organismo receptor) da mesma espécie (comunicação intraespecífica), originando neste último uma reação específica (Karlson and Luscher 1959). Estes feromônios são divididos segundo o efeito exercido sobre o organismo receptor podendo ser de casta, trilha, agregação, alarme, sexual e oviposição (Reinhard 2004).

Os aleloquímicos são compostos que mediam a comunicação entre indivíduos de espécies diferentes (interespecífica) (Law and Regnier 1971). Estes compostos são divididos de acordo com quem recebe o efeito benéfico: alomônios quando o favorecido é a espécie emissora; cairomônios que favorecem a espécie receptora; sinomônios em que ambos, emissor e receptor são favorecidos e os apneumônios quando o composto é emitido por um material inerte, por exemplo, água com matéria orgânica para oviposição de culicídeos (Nordlund and Lewis 1976, Agelopoulos and Wadhams 2000).

Contudo, a classificação dos semioquímicos é complexa, devido ao fato de que muitas substâncias podem apresentar dualidade de função, agindo como feromônio dentro de uma espécie, e ser utilizado como alomônio, cairomônio ou sinomônio para outra (Brown Jr et al. 1970, Reinhard 2004).

Outras particularidades relevantes quando se trata de semioquímicos é que muitos deles são misturas de substâncias, sendo que, a composição e a proporção destas substâncias podem produzir diferentes tipos de respostas em um indivíduo (Reinhard 2004).

1.4.1. ECOLOGIA QUÍMICA EM FLEBOTOMÍNEOS CAIROMÔNIOS

Os cairomônios nos flebotomíneos, assim como em outros insetos hematófagos, são importantes para vários aspectos da biologia destes insetos como a localização de açúcares, de hospedeiros como fonte sanguínea e na procura de locais com características ótimas para o desenvolvimento das fases imaturas. Muitas das pesquisas em relação a esses aspectos têm sido dirigidas para *Lu. longipalpis*, o principal vetor da leishmaniose visceral nas Américas.

Os açúcares ingeridos tanto por machos quanto por fêmeas de flebotomíneos têm importante papel na epidemiologia das leishmanioses; sendo capazes de alterar o desenvolvimento dos parasitas, assim como incrementar as taxas de sobrevivência e oviposição de muitas das espécies criadas em laboratório (Cameron et al. 1995b, Hamilton and El Naiem 2000). Desse ponto de vista, algumas pesquisas têm sido realizadas com o objetivo de identificar e avaliar as diversas fontes de açúcar na natureza, preferidas pelos flebotomíneos, sendo as principais flores (Müller et al. 2011), frutos (Junnla et al. 2011a, Junnla et al. 2011b), seivas de plantas, exudados de afídeos e coccídeos (Moore et al. 1987, Cameron et al. 1995b, Cameron et al. 1995a). A identificação dos voláteis envolvidos na localização dessas fontes pode auxiliar no desenvolvimento de atrativos para o controle dos flebotomíneos.

Uma característica importante de muitos dos flebotomíneos é o comportamento hematófago oportunista, alimentando-se de uma ampla variedade de hospedeiros; dependendo da disponibilidade dessas fontes. Sabendo que as fêmeas dos flebotomíneos precisam de sangue como fonte de proteínas para o amadurecimento dos ovários e produção de ovos, diferentes pesquisas têm sido realizadas no sentido de determinar a preferência sanguínea em fêmeas das diferentes espécies de flebotomíneos e a influência dessas fontes na fecundidade e sobrevivência das mesmas durante e após oviposição. Em *Phlebotomus papatasi* foi avaliada a taxa de fertilidade e sobrevivência das fêmeas após ingestão de sangue em diferentes hospedeiros, humano, cavalo, cabra, porco, cachorro, coelho, hamster e porquinho-da-índia, não sendo encontrada diferença significativa entre as fontes sanguíneas (Harre et al. 2001). Em *Lu. ovallesi*, num estudo

similar, as fêmeas apresentaram melhor resposta quando alimentadas com sangue de galinha do que porco, vaca, cabra, cachorro, humano e cavalo (Noguera et al. 2006). Em um ensaio em laboratório para *Lu. longipalpis*, vetor adaptado às áreas periurbanas, houve melhores taxas de oviposição em fêmeas alimentadas em porquinho-da-índia ou cavalo; mesmo assim o sangue humano foi a fonte sanguínea mais comum em fêmeas ingurgitadas desta espécie (Macedo-Silva et al. 2014).

Outra característica importante ligada à hematofagia é a capacidade de localizar e discriminar os diferentes hospedeiros. Neste sentido, estudos de campo e laboratório foram realizados para determinar os compostos envolvidos neste processo. Tais estudos demonstraram a atratividade em fêmeas e machos de *Lu. longipalpis* para compostos emanados da pele humana, sendo as fêmeas mais fortemente atraídas que machos (Hamilton and Ramsoondar 1994, Rebollar-Tellez et al. 1999, Bray and Hamilton 2007); assim como ocorreu com odores de animais (Dougherty et al. 1999). Compostos liberados durante a respiração dos hospedeiros também têm sido alvo de pesquisas, como o CO₂, ativador universal para insetos hematófagos, que foi avaliado em conjunto com armadilhas luminosas, melhorando significativamente as capturas destes insetos (Chaniotis 1983). Em um estudo em campo com *Ny. intermedia* e *Ny. whitmani*, a armadilha com CO₂ capturou pouco menos da metade dos insetos, quando comparados à armadilha com o total dos voláteis emanados por um humano (Pinto et al. 2001). A atratividade do octenol (3-Octen-1-ol) para flebotomíneos, composto liberado durante a respiração de vertebrados, e atrativo para diferentes espécies de mosquitos, foi verificada em ensaios de campo em *Ph. papatasi* (Beavers et al. 2004) e em ensaios de campo e túnel de vento em laboratório para *Ny. neivai* (Pinto et al. 2011, Pinto et al. 2012); estudos prévios com eletroantenografia em *Lu. longipalpis* tinham evidenciado a capacidade destes insetos em detectar este composto (Sant'Ana et al. 2002). Em ensaios realizados em túnel de vento, verificou-se que fêmeas e machos de *Lu. longipalpis* foram atraídos para alguns voláteis de plantas como 1-heptanol e 1-nonanol (Magalhães-Junior et al. 2014). Um ensaio similar com *Ny. neivai* demonstrou que estes insetos são atraídos para outros dois álcoois, 1-hexanol e 1-octanol (Machado et al. 2015).

Ensaio de atratividade indicaram que hamsters infectados com *Leishmania infantum* foram mais atrativos para fêmeas de *Lu. longipalpis* do que hamsters não infectados (O'Shea et al. 2002). Esse resultado foi reforçado em outro estudo onde os mesmos animais foram avaliados, para a atratividade de *Lu. Longipalpis*, antes e após a

infecção com *L. infantum*, apresentando aumento da atratividade após a infecção (Nevatte et al. 2017).

FEROMÔNIOS

Em relação à feromônios em flebotomíneos, *Lu. longipalpis* é a espécie mais amplamente estudada. Cinco diferentes tipos de feromônios sexuais foram identificados em machos deste complexo de espécies (Spiegel et al. 2016). Os machos de *Lu. longipalpis* produzem o feromônio em glândulas localizadas nos tergitos abdominais (Mangabeira 1969) o qual é liberado ao exterior através de poros ou pápulas (Barth 1961, Lane and Ward 1984). Em flebotomíneos as fêmeas, únicas hematófagas, precisam fazer um repasto sanguíneo como fonte de proteínas para produção dos ovos. Os machos, primeiros a localizar um hospedeiro, formam um agrupamento, ou *lek*, ao redor do hospedeiro, liberando feromônios que atraem fêmeas e um maior número de machos (Spiegel et al. 2005). Existem cinco quimiotipos de feromônios identificados em *Lu. longipalpis*, 9-metil-germacreno-B, 3-metil-himachaleno, cembreno-1 e cembreno-2, e 9-metilgermacreno-B⁺ (Hamilton et al. 1996a, Hamilton et al. 1996b, Hamilton et al. 1999, Brazil and Hamilton 2002, Hamilton et al. 2004, Hamilton et al 2005). Os dois primeiros, 9-metil-germacreno-B e 3-metil-himachaleno já foram sintetizados. Além de *Lu. longipalpis* o feromônio sexual de seis outras espécies: *Evandromyia carmelinoi*, *Ev. lenti*, *Lu. cruciata*, *Lu. cruzi*, *Lu. lichyi*, *Pi. pessoai* foram identificadas (Hamilton and Ward, 1994, Hamilton et al., 1999, Brazil and Hamilton, 2002, Hamilton et al 2002, Serrano et al 2016).

Em relação ao comportamento de oviposição em flebotomíneos, os fatores que direcionam a escolha do sítio de oviposição em fêmeas grávidas foram estudados na espécie *Lu. longipalpis*. Dados de laboratório mostraram que a oviposição era maior em locais com ovos coespecíficos, além do que, a idade e o número dos ovos foram cruciais para elucidar uma resposta significativa em fêmeas grávidas (Elnaiem and Ward 1990,1991). Extratos hexânicos de ovos de *Lu. longipalpis* e glândulas acessórias de fêmeas grávidas permitiram identificar este feromônio como sendo o ácido dodecanóico (Dougherty and Hamilton 1997).

Além do ácido dodecanóico, outros estimulantes para a oviposição em *Lu. longipalpis* foram descritos como o *frass*, formado por restos acumulados em potes de criação de imaturos (Elnaiem and Ward 1992b, Dougherty et al. 1993), e os compostos hexanal e 2-metil-2-butanol, identificados em fezes de aves e coelhos (Dougherty et al. 1995). Além da natureza química dos atrativos, foi evidenciada a preferência das fêmeas

para oviporem em superfícies irregulares e fendas (Elnaiem and Ward 1992a). Entretanto, em *Ph. papatasi* foi verificada a reposta para ovos coespecíficos (Wasserberg and Rowton 2011, Kumar et al. 2013, Marayati et al. 2015). Em outras espécies de flebotomíneos, como por exemplo, *Lu. shannoni* não foi possível evidenciar uma resposta significativa de fêmeas grávidas para ovos coespecíficos ou para o ácido dodecanóico (Mann and Kafman, 2010).

2. JUSTIFICATIVA

Dada a relevância epidemiológica dos flebotomíneos na transmissão das leishmanioses, diferentes áreas de estudo da biologia desses insetos são necessárias, como por exemplo, métodos de criação apropriados para cada espécie, interação parasita-vetor, competência e capacidade vetorial, e ecologia química, entre outros. O cerne principal do presente trabalho é direcionado a esse último aspecto, a investigação dos compostos voláteis envolvidos em processos biológicos fundamentais para o desenvolvimento dos flebotomíneos. A revisão de literatura aponta a necessidade de mais estudos na área de ecologia química desse grupo de vetores. A partir dos estudos básicos pode-se tanto entender melhor a biologia desses insetos quanto, talvez no médio ou longo prazo, produzir conhecimentos que auxiliem no desenvolvimento de melhores iscas atrativas para monitoramento ou controle.

No **primeiro capítulo**, direcionado ao estudo de cairomônios, serão avaliadas duas iscas atrativas, desenvolvidas a partir de compostos liberados por seres humanos, para espécies antropofílicas de culicídeos. A pergunta principal desse capítulo foi se, em uma área com diferentes espécies de flebotomíneos, essas iscas poderiam atrair diferencialmente espécies mais antropofílicas.

No **segundo capítulo**, o mote foi investigar a presença ou indicação de feromônios sexuais e de oviposição em quatro espécies incriminadas como vetoras de LTA: *Ny. neivai*, *Ny. whitmani*, *Pi. fischeri*, e *Mg. migonei*.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

- Investigar os compostos envolvidos no comportamento de busca do hospedeiro, cópula e oviposição assim como ampliar os conhecimentos técnicos na área de ecologia química de flebotomíneos.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito potencializador de duas iscas comerciais que imitam o odor humano, BG-Lure®, BG-Sweetscent®, em armadilhas luminosas para a captura de flebotomíneos em campo.
- Investigar a presença de compostos voláteis envolvidos nos comportamentos de oviposição e cópula em flebotomíneos.
- Investigar o micro-extração em fase sólida (SPME) como método alternativo à extração com solventes, para a detecção de feromônios sexual e oviposição em flebotomíneos.

CAPITULO I.

RESUMO

AVALIAÇÃO DA ATRATIVIDADE DE BG-LURE E BG-SWEETSCENTS PARA COLETAS DE FLEBOTOMÍNEOS EM CAMPO (DIPTERA: PSYCHODIDAE)

Os insetos hematófagos usam pistas olfativas e visuais para estabelecer diversas associações com seu ambiente, por exemplo, para localizar diversas fontes de açúcar, hospedeiros (sangue), na procura de parceiros e na escolha de local para oviposição. Esses insetos detectam e localizam seus hospedeiros através dos compostos químicos ou cairomônios emanados por eles. Os compostos sinalizadores mais utilizados são CO₂, ácidos carboxílicos, aldeídos, álcoois e cetonas. Esses cairomônios estão sendo utilizados comercialmente em misturas, com a finalidade de incrementar a captura de insetos hematófagos. Duas iscas comerciais, BG-Lure® e BG-Sweetscent® que utilizam uma mistura de cairomônios de seres humanos (ácido láctico, amônia e ácido capróico) as quais foram utilizadas na coleta de culicídeos. Os flebotomíneos são importantes vetores de distintos patógenos como bactérias, vírus e protozoários. O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito potencializador de duas iscas comerciais, BG-Lure®, BG-Sweetscent®, em armadilhas luminosas sobre a captura de flebotomíneos em campo. Este estudo foi realizado entre setembro e outubro de 2016 em duas áreas de floresta secundária, localizadas na periferia da região urbana e periurbana do município de Assis-Brasil, AC. As armadilhas foram operadas entre as 18:00h e 6:00h do dia seguinte. Três tratamentos foram avaliados: 1. Armadilha luminosa+BG-Lure®; 2. Armadilha luminosa+BG-Sweetscent® e 3. Armadilha luminosa. O delineamento de quadrados latinos foi aplicado, as espécies com maior abundância foram analisadas estatisticamente pelo Modelo Linear Misto Generalizado. Um total de 3.682 flebotomíneos foram coletados e identificados em 14 gêneros e 39 espécies. As três espécies com maior abundância, foram *Pintomyia nevesi* (Damasceno & Arouck, 1956) com 739 espécimes (20.1%), *Nyssomyia whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939), 1093 (29,7%) e *Nyssomyia antunesi* (Coutinho, 1939), 540 (14,7%). Apenas para *Ny. whitmani* houve uma ligeira indicação de um aumento nas capturas com BG-Lure®.

PALAVRA-CHAVE: atrativos, vigilância vetorial, *Ny. whitmani*, *Ny. antunesi*, *Pi. nevesi* semioquímicos.

**FIELD EVALUATION OF ATTRACTIVE BAITS OF CULICIDAE (BG-LURE
AND BG-SWEETSCENTS) FOR COLLECTING PHLEBOTOMINE SAND
FLIES (DIPTERA: PSYCHODIDAE)**

ABSTRACT

Hematophagous insects use olfactory and visual cues to establish numerous associations with their environment and to locate diverse sugars sources, hosts, mates, and site for oviposition. These insects detect and locate their hosts through the chemical compounds emanated by them. The preferred compounds are CO₂, carboxylic acids, aldehydes, alcohols and ketones. These compounds or kairomones are being commercially used in mixtures, in order to increase the capture of hematophagous insects. Two commercial baits, BG-Lure® and BG-Sweetscent® that utilize a mixture of human kairomones (lactic acid, ammonia and caproic acid) were initially developed for culicidae. Phlebotomines are important vectors of bacteria, viruses and protozoa. The aim of the present study was to evaluate the potentiating effect of two commercial baits, BG-Lure®, BG-Sweetscent®, on light traps for capture of sandflies in the field. This study was conducted between September and October 2016 in two woodland areas, located on the edge of the urban and periurban region of Assis-Brasil-AC, Brazil. Traps were operated between 18:00 and 6:00 h the next day. Three treatments were evaluated: 1. light trap + BG-Lure®; 2. light trap + BG-Sweetscent® and 3. light trap. The design of Latin squares was applied, the species with greater abundance were analyzed statistically by Generalized Linear Mixed Model. A total of 3,682 phlebotomines were collected, distributed in 14 genera and 39 species. The three species with greater abundance were *Pintomyia nevesi* (Damasceno & Arouck, 1956) with 739 specimens (20.1%), *Nyssomyia whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939), 1093 (29.7%) and *Nyssomyia antunesi* (Coutinho, 1939), 540 (14.7%). Only for *Ny. whitmani* there was a slight indication of an increase in catches with BG-Lure®.

Keyword: attractants, vector surveillance, *Ny. whitmani*, *Ny. antunesi*, *Pi. nevesi*, semiochemicals

1. INTRODUÇÃO

Flebotomíneos apresentam relevância epidemiológica como vetores de patógenos distintos como bactérias, vírus e protozoários. Uma ênfase especial é dada ao parasito protozoário *Leishmania* (Trypanosomatidae) responsável por mais de um milhão de novos casos de leishmaniose visceral e cutânea por ano em todo o mundo (WHO, 2018). Das cerca de 1.000 espécies de flebotomíneos identificadas, pouco mais de 10% transmitem 18 espécies de *Leishmania* para humanos (Brazil et al., 2015; Steverding, 2017). Alguns critérios têm sido usados para incriminar uma espécie de flebotomíneo como vetor importante e um deles é ser atraído e picar seres humanos e outros hospedeiros reservatórios (Killick-Kendrick, 1990; Ready, 2013). A busca por compostos voláteis emitidos por humanos pode ajudar a aumentar as capturas de espécies antropofílicas.

Os insetos hematófagos usam estímulos olfativos e visuais para estabelecer diferentes tipos de associações com seu ambiente, seja para procurar açúcar ou fontes de sangue, acasalamento ou locais de oviposição. Esse tipo de interação ocorre através de compostos químicos, denominados semioquímicos, que favorecem a comunicação entre indivíduos da mesma espécie (intraespecífica) e entre espécies diferentes (interespecíficas) (Nordlund e Lewis, 1976). Um desses compostos é o CO₂, liberado durante a respiração do hospedeiro, que é o principal componente de atração envolvido na ativação de insetos hematófagos (Nicolas e Sillans, 1989). No entanto, o CO₂ não é específico, sendo atrativo para muitas espécies.

Além do CO₂, algumas outras classes de compostos voláteis, como aminas, ácidos carboxílicos, álcoois, aldeídos, cetonas e uma mistura de vários compostos químicos que emanam da respiração e da pele de humanos e outros animais, foram identificados como responsáveis por desencadear respostas comportamentais em *Aedes aegypti*, *Anopheles gambiae* s.s. e *Culex quinquefasciatus* como resumido em Smallegange e Takken (2010); destacando-se o ácido láctico, amônia e os ácidos carboxílicos.

Diferentes misturas desses voláteis têm sido utilizadas para aumentar as capturas de insetos hematófagos no campo. A mistura de ácido láctico, amônia e ácido capróico, que mimetizam o odor humano, tem se mostrado atraente para a espécie *Ae. aegypti* (Bosh et al. 2000; Kröeckel et al. 2006). A partir desta mistura, duas iscas comerciais, BG-Lure® (Geier et al., 1999; Krockel et al., 2006) e BG-Sweetscent® (Akaratovic et

al., 2017) foram desenvolvidas e avaliadas para *Culex coronator*, *Culex quinquefasciatus*, *Aedes albopictus*, *Ae. Aegypti* e *Anopheles arabiensis* (Akaratovic e Kiser, 2017; Akaratovic et al., 2017; Batista et al., 2017; Cilek et al., 2011; Cork e Park, 1996; Geier et al., 2006).

Ambos atrativos possuem os mesmos três componentes na forma granular, sem as concentrações relatadas pelo fabricante. A principal diferença está na classe de dispensador e na vida útil do produto. O BG-Sweetscent é um sachê, eficaz por dois meses, e o BG-Lure é um cartucho plástico com aberturas, capaz de liberar por até cinco meses (Biogents, 2018).

Os estudos sobre atratividade de voláteis humanos e animais para culicídeos são bem mais desenvolvidos do que para flebotomíneos. Os seguintes compostos apresentaram atratividade em ensaios de laboratório para flebotomíneos benzaldeído, 4-hidroxi-4-metil-2-pentanona e 4-metil-2-pentanona em *Lu. longipalpis* (odores de raposa) (Dougherty et al. 1999); 1-octen-3-ol para *Ny. neivai* (Pinto et al., 2011); 6-metil-5-hepten-2-ona, 2-fenilacetaldéido e eicosano para *Lu. intermedia* (= *Nyssomyia intermedia*) (Tavares et al. 2018). Em ensaios de campo o 1-octen-3-ol foi atrativo para *Lu. longipalpis* (Andrade et al., 2008) e *Psathyromyia shannoni* (Mann et al., 2009); 1-hexen-3-ol quando combinado com o CO₂ foi atrativo para *Ps. shannoni* (Mann et al., 2009).

Em condições de campo, o BG-Mesh Lure™ apresentou melhor resposta para *Lu. longipalpis* do que para *Ny. intermedia* (Andrade et al., 2008) e *Phlebotomus tobbi* (Kasap et al., 2009). Em condições de laboratório, o BG-Mesh Lure™ não foi atrativo para *Ny. neivai* (Pinto et al., 2012).

No presente estudo, objetivamos avaliar a atratividade de BG-Lure® e BG-Sweetscent® em um município localizado no estado do Acre com alta riqueza e abundância de espécies de flebotomíneos (Ávila et al., 2018; Borges et al., 2017 Ortiz et al., 2018; Teles et al., 2016) e altas taxas de transmissão da leishmaniose cutânea. Este município em 2014 apresentou o maior coeficiente de detecção de leishmaniose tegumentar no Brasil; 130,4 casos / 100.000 habitantes (SVS, 2018).

2. OBJETIVO

- Avaliar o efeito potencializador de duas iscas comerciais que imitam o odor humano, BG-Lure®, BG-Sweetscent®, em armadilhas luminosas para a captura de flebotomíneos em campo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. LOCAL DE ESTUDO

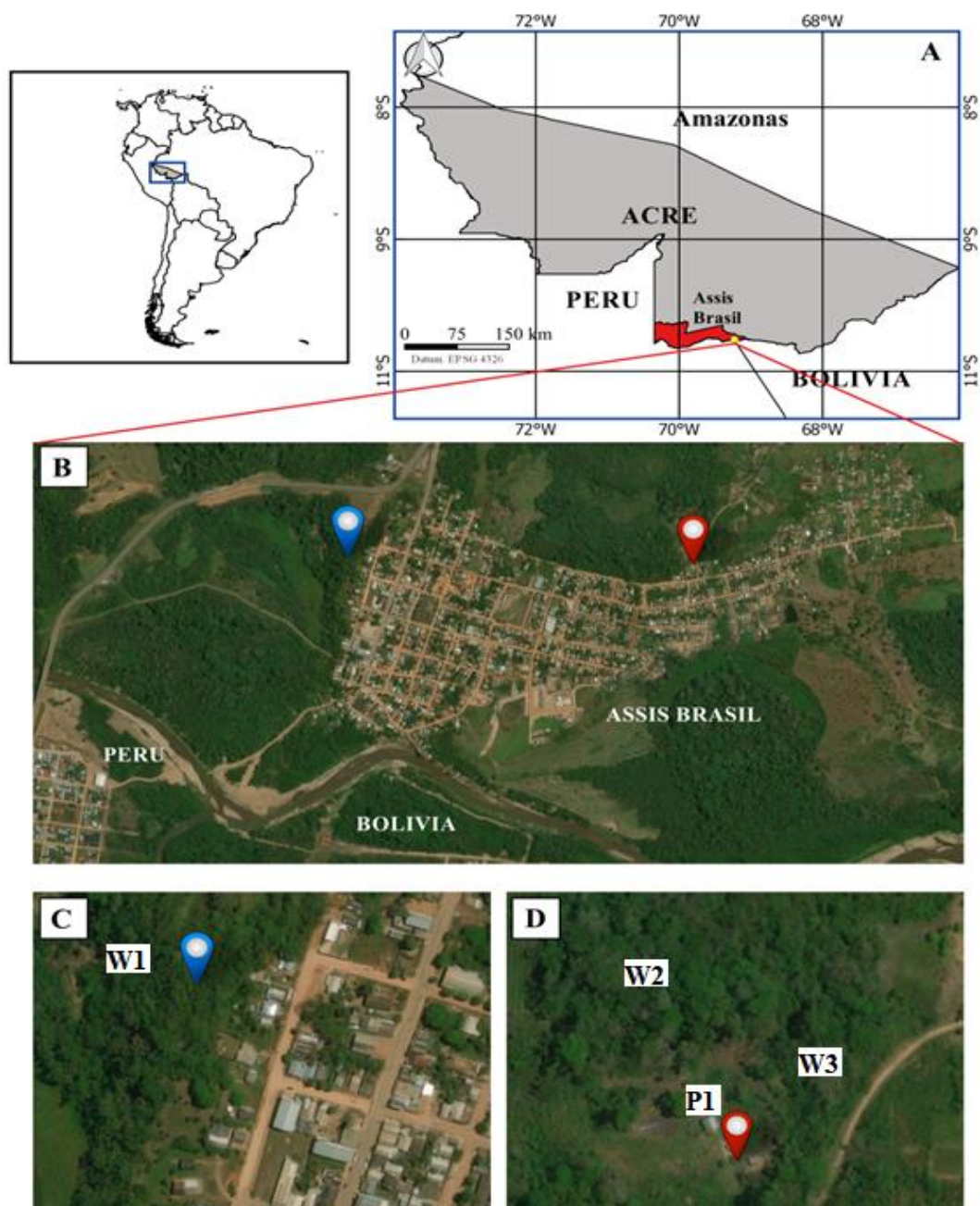
Este estudo foi realizado no período compreendido entre 16 setembro a 03 outubro de 2016 em Assis Brasil (10° 56'27.02" S; 69° 34' 4.06" W; a 239 metros acima do nível médio do mar), município situado na margem esquerda do rio Acre, no sudoeste do estado brasileiro do Acre, região limítrofe com o Peru e a Bolívia. O município possui uma área de 4.974.175 km² e uma população estimada de 6.986 habitantes (IBGE, 2018). A cobertura vegetal é predominantemente floresta aberta com palmeiras e bambus, e floresta ombrófila densa (ACRE-SEMA, 2010). O clima é do tipo equatorial úmido, sendo os meses de novembro a abril, os que apresentaram maior precipitação. Durante o período de coleta, as temperaturas máximas e mínimas médias foram de 35,2 e 22,7 °C respectivamente; a umidade média foi 83,3% (71,3 a 90,0%); e a precipitação média foi de 27,4 mm.

3.2. DESENHO DO ESTUDO

Armadilhas foram instaladas em duas áreas de coleta. Na área de coleta 1: área de floresta, na borda da zona urbana, a aproximadamente 300 metros do centro da cidade foi escolhido um local (W1). Este local caracteriza-se por grande atividade antrópica, como presença de trilha e acúmulo de lixo. Área de coleta 2: localizada a leste da área 1, a uma distância de 1.054 metros; onde foram escolhidos três locais para as armadilhas: dois locais na floresta (W2 e W3) caracterizados por serem ambientes mais preservados que o W1; adjacente a essa mata e próximo a uma casa, foi escolhido outro ponto de coleta (P1). O peridomicílio da casa (P1) foi escolhido porque residentes e vizinhos haviam apresentado histórico recente de leishmaniose cutânea. A casa é construída em madeira, sendo essa a estrutura típica das casas do município. Em ambas as áreas de coleta, havia a presença de animais domésticos, como galinhas, porcos e cães; assim como algumas árvores que abrigam as galinhas à noite. Ambas as áreas sofrem forte impacto ambiental, seja pela composição do pomar ou como consequência do crescimento urbano (Figura 1).

Para cada local escolhido, três tratamentos foram avaliados usando armadilhas luminosas Hooper Pugedo (HP) (Pugedo, 2005): 1. Armadilha de luz tipo HP, iscada com BG-Lure®; 2. Armadilha de luz HP, iscada com BG-Sweetscent® e 3. Armadilha de luz HP sem atrativos (controle). As armadilhas HP foram penduradas em galhos de árvores a 1.5 m do solo, há 30 m de distância entre si, das 18:00 às 06:00 horas. Os atrativos foram posicionados próximos à entrada das armadilhas. Nos ambientes de tipo floresta (W1, W2 e W3), os três tratamentos foram rodados em três posições, durante três noites, seguindo o desenho de quadrado latino 3X3. No ambiente peridomiciliar (P1), a rotação das armadilhas foi repetida três vezes (09 noites). Ao longo do experimento, um total de 54 armadilhas foram instaladas. Os atrativos foram fornecidos pela empresa fabricante.

Figura 1. **A.** Mapa das áreas de coleta de flebotomíneos em Assis Brasil, Acre (círculo amarelo), **B.** Vista aérea das localidades em Assis Brasil; área 1 (bandeira azul) e área 2 (bandeira vermelha), **C.** Local de coleta na área 1 (W1), **D.** Locais de coleta na área 2 (P1, peridomicílio, W2 e W3, floresta). Mapa elaborado com o software Qgis, imagens de Google Satellites. Fonte: Próprio autor.



3.3. COLETA E IDENTIFICAÇÃO DE FLEBOTOMÍNEOS

Os insetos coletados foram eutanasiados por congelamento. Os flebotomíneos foram separados de outros insetos e armazenados, por data, local, ponto e tipo de atrativo utilizado, em frascos plásticos contendo naftalina. Os frascos foram transportados para o Instituto de Biologia da Universidade de Campinas (São Paulo - Brasil) para identificação. Os insetos foram clarificados e corados de acordo com Forattini (1973), montados em Bálsamo do Canadá e identificados usando chaves morfológicas, como proposto por Galati (2018).

3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

3.4.1. ORDENAÇÃO DE ESPÉCIES

A análise de correspondência restrita foi utilizada para realizar a ordenação da comunidade de espécies de flebotomíneos capturadas com abundância maior que 1%, que poderia ser explicada pelo atrativo, local de coleta e sexo dos indivíduos. Para esta análise, para cada combinação de local, atrativo e sexo as abundâncias das três primeiras noites foram somadas. Os efeitos principais de local, sexo, atrativo e dois efeitos de interação, local×sexo e atratividade×sexo, foram analisados. Inicialmente, foi utilizado o modelo completo e testados os efeitos em uma estratégia de eliminação regressiva, usando testes de permutação. Os cálculos foram realizados com o pacote Vegan (Oksanen et al., 2018) em R (R Core Team, 2018). A ordenação de espécies e centroides dos fatores importantes foram exibidos usando as ferramentas gráficas disponíveis em Vegan.

3.4.2. ANÁLISES DAS TRÊS ESPÉCIES COM AS MAIORES ABUNDÂNCIAS E IMPORTÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA

As abundâncias das três espécies que apresentaram o maior número de indivíduos capturados na amostra foram investigadas separadamente por meio dos Modelos Lineares Generalizados Mistos (MLGM). Para padronizar o número de repetições para essas análises, apenas uma rotação das armadilhas foi considerada em P1. A parte fixa do modelo incluiu os mesmos efeitos dos fatores considerados na análise de ordenação restrita, ou seja, os efeitos principais de local, sexo e atrativo e duas das suas interações. Pontos amostrados e noites nos locais foram inseridos no modelo como efeitos aleatórios. As análises foram realizadas com o pacote lme4 v1.1-12 (Bates et al., 2015) em R. Inicialmente, aplicou-se a distribuição Poisson com função de ligação logarítmica. Para duas das espécies, os resultados mostraram alguma dispersão que indicou que o modelo não era o mais adequado. Procedeu-se então a modelagem utilizando a distribuição Binomial Negativa com função de ligação log, o que resultou em uma melhor qualidade do ajuste do modelo.

Todas as análises estatísticas foram realizadas de acordo com a orientação da Profa. Dra. Luzia Aparecida Trincado Departamento de Bioestatística da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu.

4. RESULTADOS

4.1. IDENTIFICAÇÃO DOS FLEBOTOMÍNEOS

Um total de 3.682 flebotomíneos foram coletados (2.035 fêmeas e 1.647 machos). Destes, 2.192 espécimes (59,5%) foram coletados em W1, 429 (11,7%) em W2, 415 (11,3%) em W3 e 646 (17,5%) em P1. Entre as armadilhas testadas, a armadilha luminosa iscada com BG-Lure capturou o maior número de espécimes, 1.542 (41,9%); a armadilha luminosa sem nenhum tipo de atrativo coletou 1.121 (30,4%); e a armadilha luminosa iscadas com BG-Sweetscent capturou 1.019 espécimes (27,7%) (Tabela 1, 2).

Os espécimes identificados pertenciam a 14 gêneros: *Nyssomyia* (44,86%), *Pintomyia* (24,11%), *Pressatia* (15,08%), *Evandromyia* (4,85%), *Brumptomyia* (3,93%), *Migonemyia* (1,91%), *Psathyromyia* (1,75%), *Micropygomyia* (1,09%), *Lutzomyia* (0,98%), *Psychodopygus* (0,60%), *Trichophoromyia* (0,55%), *Bichromomyia* (0,11%), *Sciopemyia* (0,11%), *Viannamyia* (0,08%) e 39 espécies.

Um total de 294 insetos foram identificados até o nível do gênero por pertencerem ao gênero *Pressatia*, onde as fêmeas são morfologicamente indistinguíveis, estes insetos foram agrupados como complexo *Pressatia*.

Onze espécies apareceram em número maior que 1%, *Nyssomyia whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939), com 29,7%; *Pintomyia nevesi* (Damasceno & Arouck, 1956) 20,1%; *Nyssomyia antunesi* (Coutinho, 1939) 14,7%; *Pressatia choti* (Floch & Abonnenc, 1941) 4,5%; *Pintomyia serrana* (Damasceno & Arouck, 1949) 3,9%; *Evandromyia saulensis* (Floch & Abonnenc, 1944) 3,1%; *Pressatia calcarata* (Martins & Silva, 1964) 2,6%; *Brumptomyia pentacantha* (Barretto, 1947) 2,2%; *Migonemyia migonei* (França, 1920) 1,9%; *Brumptomyia avellari* (Costa Lima, 1932) 1,7% e *Psathyromyia dendrophyla* (Mangabeira, 1942) 1,5%. Houve variação nas abundâncias das espécies entre os locais de coleta (Figura 2). As abundâncias relativas das espécies capturadas em relação ao tipo de atrativos utilizado são apresentadas na Figura 3.

Figura 2. Gráficos de mosaicos mostrando a abundância das 17 principais espécies de flebotomíneos capturadas para cada local de captura, Floresta 1 (W1), Floresta 2 (W2), Floresta 3 (W3) e Peridomicílio (P1). A largura das barras é proporcional ao número de indivíduos capturados para cada espécie. $\text{—}\bigcirc\text{—}$ = nenhum espécime capturado; $\text{—}\bigcirc$ = nenhum macho capturado; $\text{—}\bigcirc\text{—}$ = nenhuma fêmea capturada.

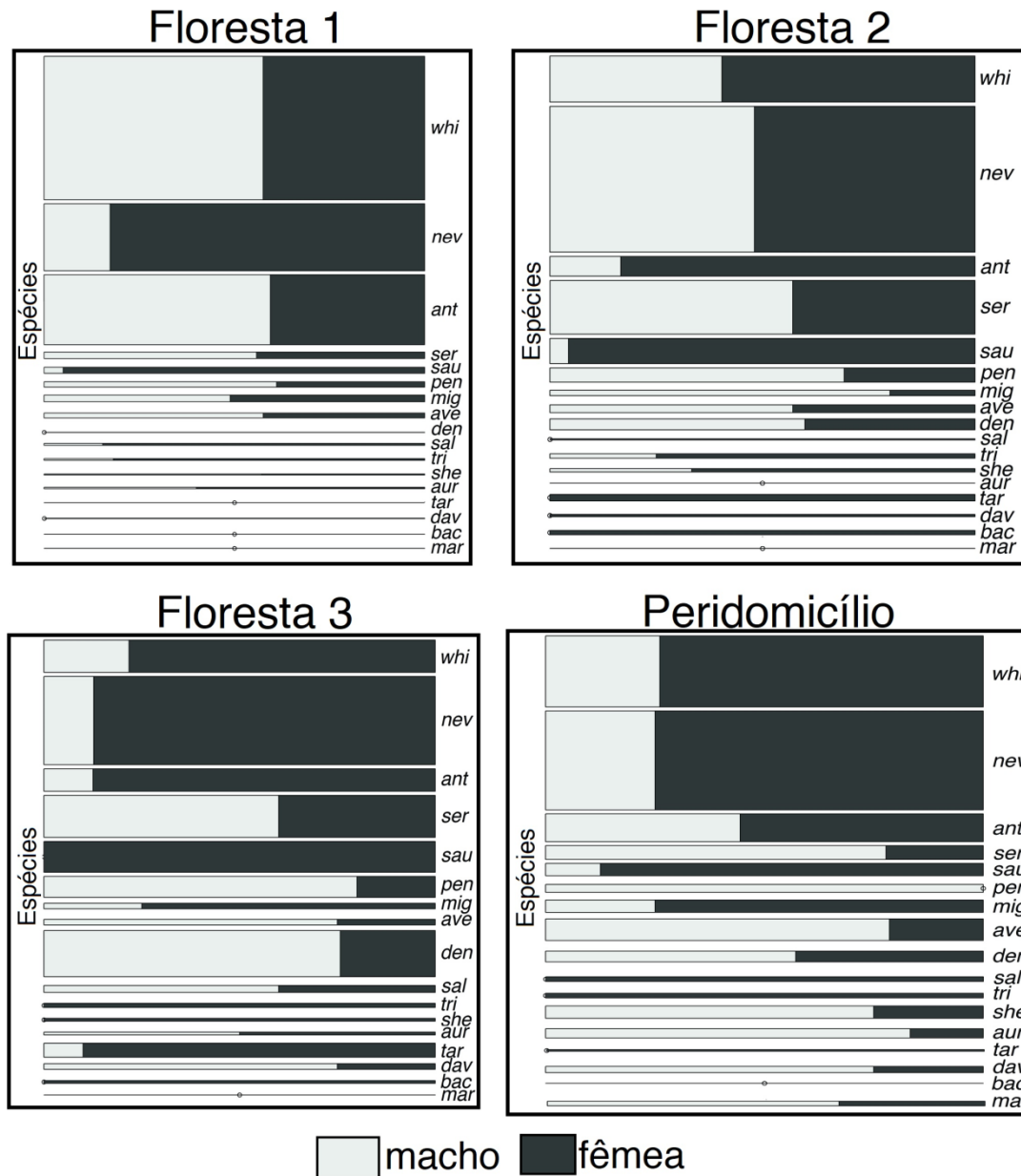


Figura 3. Gráfico de mosaico mostrando a abundância das 17 principais espécies capturadas por tipo de atrativo utilizado: BG-Lure (BGL), BG-Sweetscents (BGS) e Luz (LL). A largura das barras é proporcional ao número de indivíduos capturados para cada espécie.

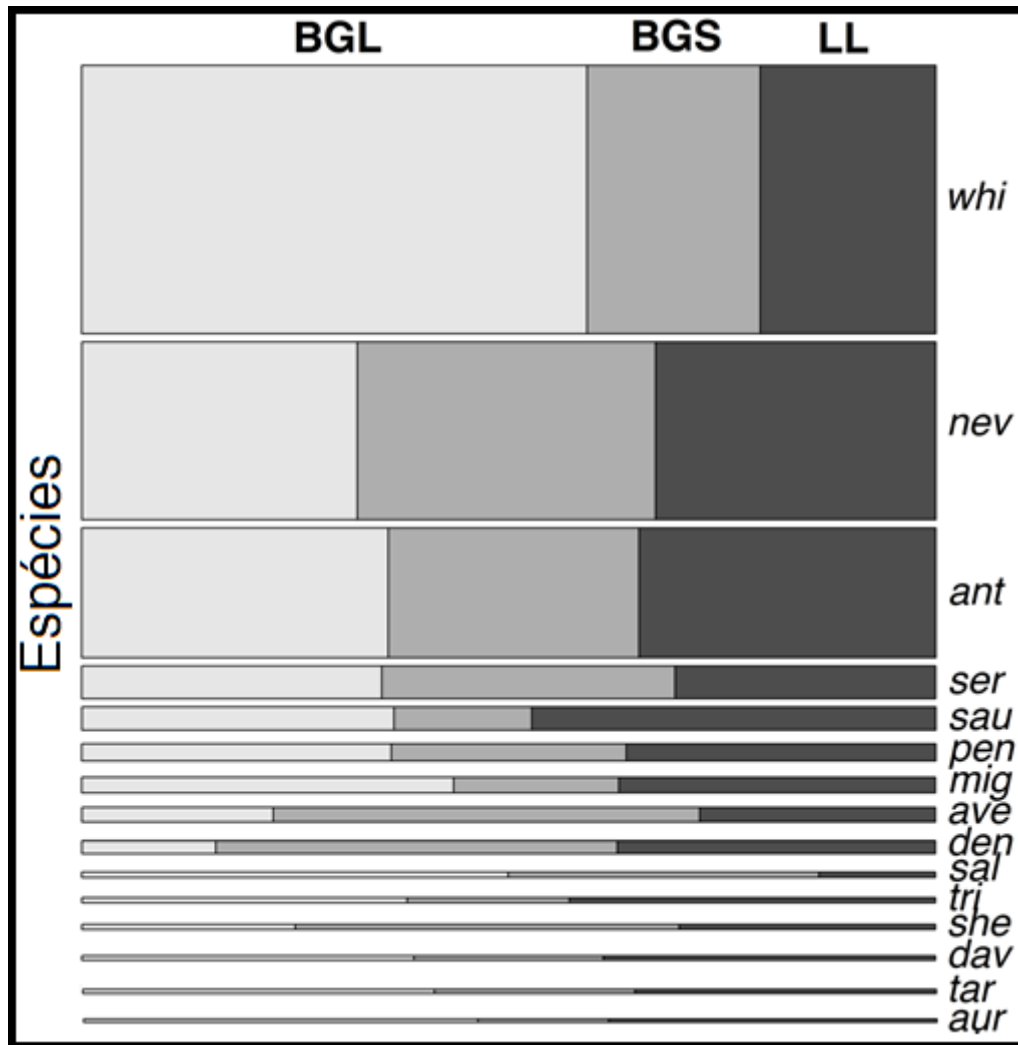


Tabela 1. Abundância das espécies de flebotomíneos coletadas em quatro locais, em diferentes áreas com armadilha luminosa sem atrativo (LL), BgLure e Luz (BGL+LL) e Sweetscent é Luz (BGS+LL); coletadas entre 16 setembro e 03 outubro 2016 em Assis Brasil, Acre, Brasil. Fonte: Próprio autor.

Espécie	Código	Floresta 1 (W1)			Floresta 2 (W2)			Floresta 3 (W3)			Peridomicílio (P1)			Subtotal			Total	Percentual do total
		LL	BGL + LL	BGS + LL	LL	BGL + LL	BGS + LL	LL	BGL + LL	BGS + LL	LL	BGL + LL	BGS + LL	LL	BGL + LL	BGS + LL		
<i>Ny. whitmani</i>	whit	189	591	179	11	23	8	8	4	11	26	21	22	234	639	220	1093	29.68
<i>Pi. nevesi</i>	nev	150	138	162	55	51	27	12	17	34	26	31	36	243	237	259	739	20.07
<i>Ny. antunesi</i>	ant	170	156	140	2	11	5	4	5	7	13	21	6	189	193	158	540	14.67
<i>Pressatia complex</i>	spp	11	7	10	20	17	13	36	39	17	39	35	50	106	98	90	294	7.98
<i>Pr. choti</i>	cho	3	5	6	14	17	4	17	20	8	28	16	26	62	58	44	164	4.45
<i>Pi. serrana</i>	ser	13	10	20	11	26	12	14	8	8	6	8	9	44	52	49	145	3.94
<i>Ev. saulensis</i>	sau	27	8	5	8	12	3	6	11	5	7	11	12	48	42	25	115	3.12
<i>Pr. calcarata</i>	cal	1	1	3	4	2	1	12	11	3	18	25	14	35	39	21	95	2.58
<i>Br. pentacantha</i>	pen	16	14	8	3	10	2	4	3	8	7	5	5	30	32	23	85	2.31
<i>Mi. migonei</i>	mig	14	24	7	2	2	1	4	0	0	5	6	5	25	32	13	70	1.90
<i>Br. avellari</i>	ave	9	5	17	1	3	3	1	1	2	2	5	9	13	14	31	58	1.58
<i>Pa. dendrophyla</i>	den	0	0	1	4	2	4	10	6	17	6	2	2	20	10	24	54	1.47
<i>Ev. sallesi</i>	sal	3	7	3	0	0	1	0	2	3	0	7	5	3	16	12	31	0.84
<i>Mi. trinidadensis</i>	tri	4	5	2	2	2	0	1	1	1	2	2	6	9	10	9	28	0.76
<i>Lu. sherlocki</i>	she	3	2	2	1	2	0	0	1	1	4	2	6	8	7	9	24	0.65
<i>Ps. davisii</i>	dav	0	2	1	0	2	0	2	2	0	10	2	1	12	8	2	22	0.60
<i>Ev. tarapacaensis</i>	tar	0	0	0	0	4	2	5	3	2	2	3	0	7	10	4	21	0.57
<i>Th. auraisensis</i>	aur	5	5	0	0	0	0	1	0	1	2	3	3	8	8	4	20	0.35
<i>Ny. shawi</i>	sha	3	7	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	4	7	1	12	0.33
<i>Ev. bacula</i>	bac	0	0	0	1	1	2	1	1	0	0	0	0	2	2	2	6	0.16
<i>Mi. oswaldoi</i>	osw	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	6	0.16
<i>Pa. bigeniculata</i>	big	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	3	2	0	5	0.14
<i>Mi. nv.sp</i>	nov	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	2	0	1	2	2	5	0.14
<i>Lu. kirigetiensis</i>	kir	0	1	0	0	2	0	1	0	0	0	1	0	1	4	0	5	0.14
<i>Pa. aragaoi</i>	ara	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	1	0	1	1	2	4	0.11
<i>Lu. marinkellei</i>	mar	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	3	0	0	3	0.08
<i>Sc. vattierae</i>	vat	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	2	1	0	3	0.08
<i>Vi. furcata</i>	fur	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2	1	3	0.08
<i>Bi. flaviscutellata</i>	fla	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	2	1	3	0.08
<i>Br. brumpti</i>	bru	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0.03
<i>Ev. andersoni</i>	and	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0.05
<i>Ev. sipani</i>	sip	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2	0.05
<i>Lu. evangelistai</i>	eva	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	2	0	2	0.05
<i>Ev. inpai</i>	inp	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0.03
<i>Pa. punctigeniculata</i>	pun	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0.03
<i>Mi. micropgyga</i>	mic	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0.03
<i>Lu. flabellata</i>	flab	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0.03
<i>Lu. gonzaloi</i>	gon	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0.03
<i>Sc. servulolimai</i>	serv	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0.03
<i>Bi. reducta</i>	red	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0.03
Flebotomíneos danificados	dam	0	1	4	0	2	0	1	1	0	2	1	3	3	5	7	15	0.41
Riqueza de espécies	R	18	19	18	16	24	15	19	19	20	22	22	17	29	32	27	39 sp.	NA
Especímenes capturados	N	625	992	575	141	199	89	142	139	134	213	212	221	1121	1542	1019	3682	100.00

Tabela 2. Abundância das espécies de flebotomíneos por sexo (M=macho e F=fêmea) e tipo de armadilha: armadilha luminosa sem atrativo (LL), BgLure e Luz (BGL+LL) e Sweetscent é Luz (BGS+LL); coletadas entre 16 setembro e 03 outubro de 2016 em Assis Brasil, Acre, Brasil. Fonte: Próprio autor.

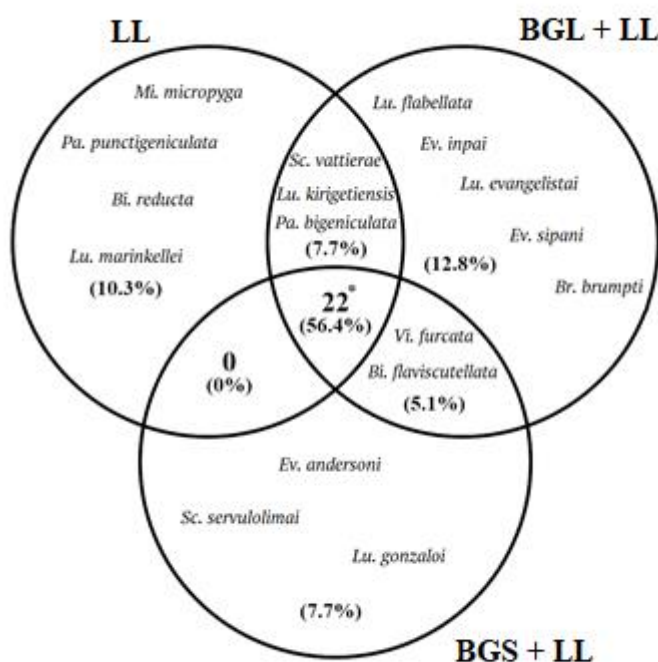
Espécies	Cod.	Armadilhas						Total		
		LL		BGL + LL		BGS + LL		M	F	MF
		M	F	M	F	M	F			
<i>Ny. whitmani</i>	<i>whit</i>	101	133	372	267	116	104	589	504	1093
<i>Pi. nevesi</i>	<i>nev</i>	59	184	51	186	59	200	169	570	739
<i>Ny. antunesi</i>	<i>ant</i>	116	73	91	102	88	70	295	245	540
<i>Pressatia complex</i>	<i>spp</i>	ind*	106	ind*	98	ind*	90	-	294	-
<i>Pr. choti</i>	<i>cho</i>	62	ind*	58	ind*	44	ind*	164	-	-
<i>Pi. serrana</i>	<i>ser</i>	32	12	27	25	25	24	84	61	145
<i>Ev. saulensis</i>	<i>sau</i>	4	44	4	38	2	23	10	105	115
<i>Pr. calcarata</i>	<i>cal</i>	35	ind*	39	ind*	21	ind*	95	-	-
<i>Br. pentacantha</i>	<i>pen</i>	18	9	18	12	18	5	54	26	80
<i>Mg. migonei</i>	<i>mig</i>	11	14	13	19	5	8	29	41	70
<i>Br. avellari</i>	<i>ave</i>	9	7	10	4	20	11	39	22	61
<i>Pa. dendrophyla</i>	<i>den</i>	14	6	7	3	14	10	35	19	54
<i>Ev. sallesi</i>	<i>sal</i>	0	3	4	12	5	7	9	22	31
<i>Mi. trinidadensis</i>	<i>tri</i>	1	8	3	7	1	8	5	23	28
<i>Lu. sherlocki</i>	<i>she</i>	6	2	3	4	6	3	15	9	24
<i>Ps. davis</i>	<i>dav</i>	8	4	3	5	1	1	12	10	22
<i>Ev. tarapacaensis</i>	<i>tar</i>	0	7	1	9	0	4	1	20	21
<i>Th. auraensis</i>	<i>aur</i>	4	4	4	4	4	0	12	8	20
<i>Ny. shawi</i>	<i>sha</i>	0	4	0	7	0	1	0	12	12
<i>Mi. oswaldoi</i>	<i>osw</i>	1	1	0	2	0	2	1	5	6
<i>Ev. bacula</i>	<i>bac</i>	0	2	0	2	0	2	0	6	6
<i>Lu. kirigetiensis</i>	<i>kir</i>	1	0	4	0	0	0	5	0	5
<i>Pa. bigeniculata</i>	<i>big</i>	0	3	0	2	0	0	0	5	5
<i>Mi. nv. sp.</i>	<i>nov</i>	1	0	2	0	0	2	3	2	5
<i>Pa. aragaoi</i>	<i>ara</i>	1	0	1	0	2	0	4	0	4
<i>Br. brumpti</i>	<i>bru</i>	0	0	1	2	0	0	1	2	3
<i>Sc. vattierae</i>	<i>vat</i>	0	2	0	1	0	0	0	3	3
<i>Vi. furcata</i>	<i>fur</i>	0	0	0	2	0	1	0	3	3
<i>Bi. flaviscutellata</i>	<i>fla</i>	0	0	0	2	0	1	0	3	3
<i>Lu. marinkellei</i>	<i>mar</i>	2	1	0	0	0	0	2	1	3
<i>Ev. andersoni</i>	<i>and</i>	0	0	0	0	2	0	2	0	2
<i>Lu. evangelistai</i>	<i>eva</i>	0	0	0	2	0	0	0	2	2
<i>Ev. sipani</i>	<i>sip</i>	0	0	1	1	0	0	1	1	2
<i>Pa. punctigeniculata</i>	<i>pun</i>	0	1	0	0	0	0	0	1	1
<i>Bi. reducta</i>	<i>red</i>	1	0	0	0	0	0	1	0	1
<i>Lu. flabellata</i>	<i>flab</i>	0	0	1	0	0	0	1	0	1
<i>Ev. inpai</i>	<i>inp</i>	0	0	1	0	0	0	1	0	1
<i>Sc. servulolimai</i>	<i>serv</i>	0	0	0	0	0	1	0	1	1
<i>Lu. gonzaloi</i>	<i>gon</i>	0	0	0	0	0	1	0	1	1
<i>Mi. microgyga</i>	<i>mic</i>	0	1	0	0	0	0	0	1	1
Flebotomíneo danificado	<i>dam</i>	3	0	1	4	4	3	8	7	15
Riqueza de espécies	<i>R</i>	21	24	24	26	18	23	28	32	39
Especímenes capturados	<i>N°</i>	490	631	720	822	437	582	1647	2035	3682

ind*: fêmeas indistinguíveis.

No total, 39 espécies de flebotomíneos foram coletadas, 22 espécies (56,4%) foram capturadas nas três iscas avaliadas (incluindo *Pi. nevesi*, *Ny. whitmani* e *Ny. antunesi*). Das outras 17 espécies, apenas três (7,7%) foram capturadas tanto na armadilha luminosa quanto na BGL, outras duas espécies (5,1%) foram capturadas nos atrativos BGL e BGS. Algumas espécies foram coletadas exclusivamente em iscas específicas: cinco em BGL (12,8%), quatro em luz (10,3%) e três em BGS (7,7%) (Figura 4).

Entre todos os locais de captura, a maior riqueza ocorreu em W2 com BG-Lure (24 spp). Nas armadilhas, luminosa e BG-Sweetscent, 16 spp e 15 spp foram coletadas respectivamente (Tabela 1).

Figura 4. Diagrama de Venn para riqueza de espécies de flebotomíneos por tipo de atrativo, número e porcentagem das espécies comuns entre eles. Fonte: Próprio autor



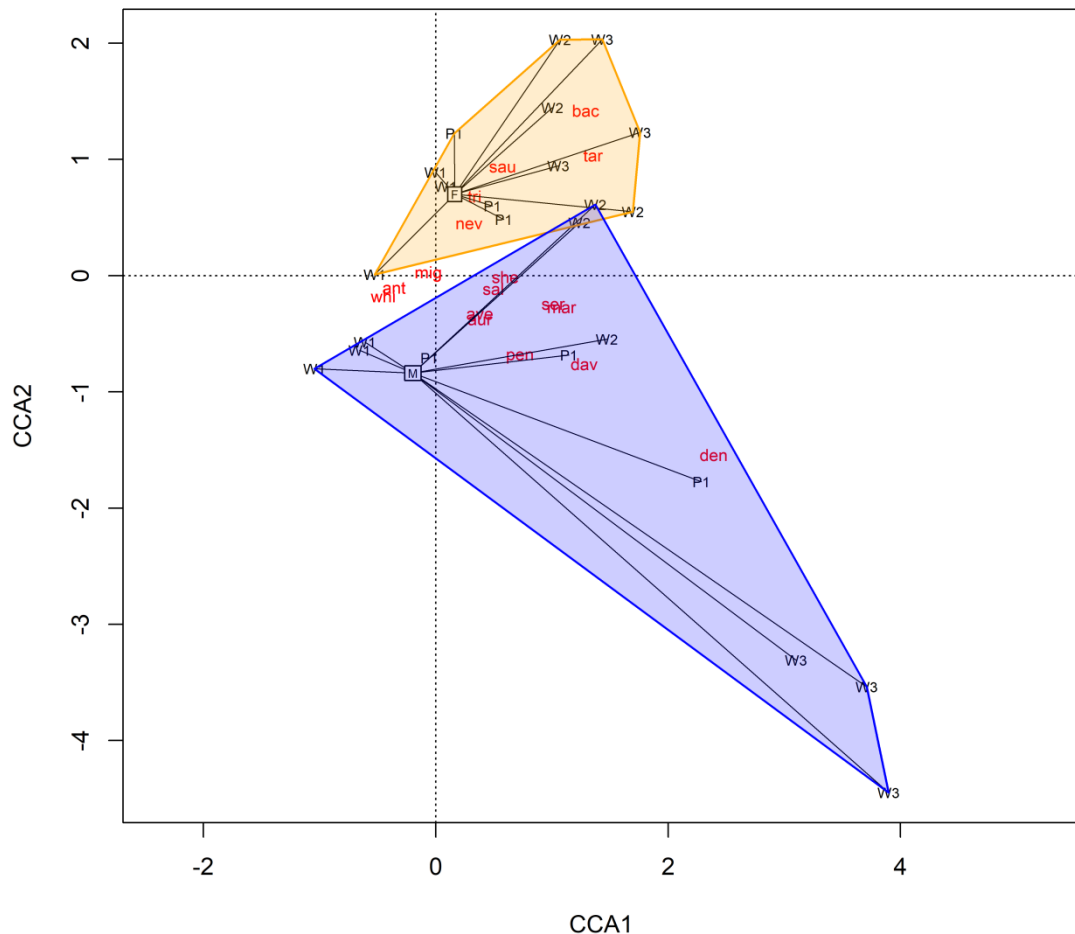
4.2. ORDENAÇÃO DAS ESPÉCIES

Espécies com abundância maior que 1% para cada local de coleta foram consideradas nas análises. Seguindo a estratégia de eliminação regressiva para testar os fatores na análise de ordenação de espécies não foram encontrados efeitos significativos da interação sexo×atrativo ($p=0,606$) e esse termo foi removido. A interação entre local×sexo foi significativa ($p=0,001$), bem como efeito principal do atrativo ($p=0,041$). Então, o modelo final incluiu os principais

efeitos dos três fatores e a interação local×sexo. A inércia total nos dados das espécies é de 1.3059, dos quais 83,2% são explicados pelos efeitos incluídos no modelo.

Quanto ao local e sexo, *Ny. whitmani* (whi), *Ny. antunesi* (ant) e *Mi. migonei* (mig), o diagrama indica que a abundância para machos e fêmeas para estas espécies está em igual proporção entre os sexos (F: M) e relacionadas com W1. Mesmo com menores abundâncias, as fêmeas da espécie *Pi. nevesi* (nev), *Lu. trinidadensis* (tri) e *Ev saulensis* (sau) estão relacionadas com W1 e P1 (Figura 5).

Figura 5. Análises de correspondência restrita das espécies com capturadas explicadas pelo sexo (M=macho e F=fêmea). Os scores para cada local (W1, W2, W3 e P1) são calculados a partir das capturas ao longo das noites e os agrupamentos são apresentados em forma de polígonos para cada sexo. *Ny. antunesi* (ant), *Ny. whitmani* (whi), *Mg. migonei* (mig), *Pi. nevesi* (nev), *Mi. trinidadensis* (tri), *Ev. saulensis* (sau), *Ev. tarapacaensis* (tar), *Ev. bacula* (bac), *Lu. sherlocki* (she), *Ev. sallesi* (sal), *Br. avellari* (ave), *Th. auraensis* (aur), *Pi. serrana* (ser), *Lu. marinkellei* (mar), *Br. pentacantha* (pen), *Ps. davisi* (dav), *Pa. dendrophyla* (den). Fonte: Próprio autor.



As espécies *Pi. nevesi*, *Ny. whitmani* e *Ny. antunesi*, as quais apresentaram maior abundância foram avaliadas estatisticamente pelo MLGM. Vários ajustes foram necessários

para se chegar ao modelo que melhor explicasse as variáveis envolvidas nas capturas tanto fixas como, local, atrativo e sexo e variáveis aleatórias, ponto da armadilha e noite (Tabela 3).

Para *Pi. nevesi* maior número de indivíduos foram capturados nos locais W1 e W2 com as fêmeas prevalecendo em W1 (Tabela 4, Figura 7A). Com o ajuste do modelo inicial proposto (Poisson com função de ligação log), não foi observada significância da interação sexo×atrativo ($p=0.835$), mas houve forte evidência de interação entre local×sexo ($p<0,0001$). Ao simplificar mais o modelo, resultou em nenhum efeito significativo do atrativo ($p=0,466$) (Tabela 3). Na Tabela 5, o modelo final é apresentado de forma detalhada.

Tabela 3. Critérios de Informação de Akaike (AIC) e Informação Bayesiano de Schwarz (BIC), para cada um dos modelos estudados para a avaliação das capturas de *Pi. nevesi*, *Ny. antunesi* e *Ny. whitmani*. * Indica o modelo final. Fonte: Próprio autor

Spp.	Variáveis	Modelo	Distribuição	AIC	BIC	Interação - Pr(Chi)			
<i>Pi. nevesi</i>	local + sexo + atrativo + local×sexo + sexo×atrativo + (1 noite) + (1 ponto×local)	1	Poisson	529.30	566.90	local×sexo***	<0,0001	sexo×atrativo	0.8352
	local + sexo + atrativo + local×sexo + (1 noite) + (1 ponto×local)	1b	Poisson	525.70	557.9	local×sexo***	<0,0001	atrativo	0.4658
	local + sexo + local×sexo + (1 noite) + (1 ponto×local)	1c*	Poisson	523.2	550.0	local×sexo***	<0,0001	-	-
	local + sexo + local×sexo + (1 noite) + (1 ponto×local)	1d	binomial negativa	499.4	528.9	local×sexo**	<0,0001	-	-
<i>Ny. whitmani</i>	local + sexo + atrativo + local×sexo + sexo×atrativo + (1 noite) + (1 ponto×local)	2	Poisson	544.56	582.1	local×sexo***	<0,0001	sexo×atrativo***	<0,0001
	local + sexo + atrativo + local×sexo + sexo×atrativo + (1 noite) + (1 ponto×local)	2b	binomial negativa	479.13	519.4	local×sexo**	0.00588	sexo×atrativo	0.4698
	local + sexo + atrativo + local×sexo + (1 noite) + (1 ponto×local)	2c*	binomial negativa	476.6	511.4	local×sexo**	0.00464	atrativo*	0.0497
<i>Ny. antunesi</i>	local + sexo + atrativo + local×sexo + sexo×atrativo + (1 noite) + (1 ponto×local)	3	Poisson	406.6	444.2	local×sexo***	<0,0001	sexo×atrativo*	0.0191
	local + sexo + atrativo + local×sexo + sexo×atrativo + (1 noite) + (1 ponto×local)	3b	binomial negativa	390.5	430.7	local×sexo**	0.00881	sexo×atrativo	0.9316
	local + sexo + atrativo + local×sexo + (1 noite) + (1 ponto×local)	3c	binomial negativa	386.6	421.5	local×sexo**	0.00797	atrativo	0.2489
	local + sexo + local×sexo + (1 noite) + (1 ponto×local)	3d*	binomial negativa	385.4	414.9	local×sexo**	0.00859	-	-

Locais: Floresta1 (W1), Floresta2 (W2), Floresta3 (W3) e Peridomicílio (P1); **Sexo:** machos e fêmeas; **Atrativos:** L=Luz; BGL=Bg-Lure; BGS= BG-Sweetscent. **Noite:** 18hrs-06hrs. **AIC:** critério da informação de Akaike, **BIC:** Critério de Informação Bayesiano. **Pr(chi).** < 0.0001***; 0.001**, 0.01*.

Nyssomyia whitmani foi mais abundante no local W1 (Figura 7B). Com o ajuste do modelo para binomial negativo com função de ligação log houve evidência de interação entre local×sexo ($p=0,0058$), mas nenhuma interação entre sexo×atrativo ($p= 0,470$). Eliminar as interações não significativas resultou ao modelo final mais adequado (Tabela 3).

Tabela 4. Média aritmética ajustada pelo GLMM para as capturas das três espécies mais abundantes coletadas entre 16 de setembro e 03 de outubro de 2016 em Assis Brasil, Acre, Brasil. Fonte: Próprio autor.

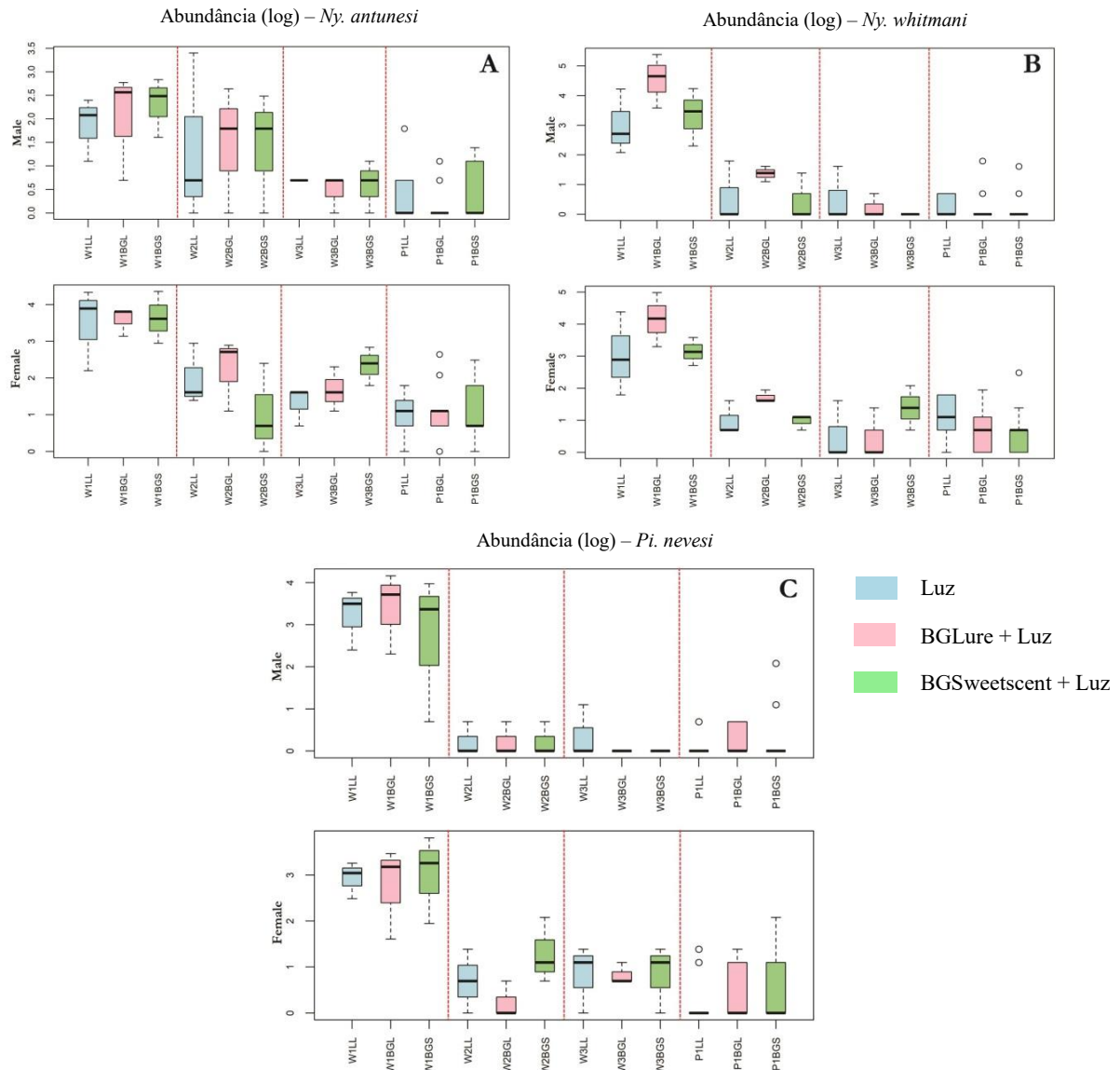
Espécies	Sexo	Floresta1 (W1)	Floresta2 (W2)	Floresta3 (W3)	Peridomicílio1 (P1)
		Média (DP)			
<i>Pi. nevesi</i>	M	8,67 (2,82)	7,11 (2,82)	0,89 (2,98)	0,70 (2,86)
	F	41,34 (2,81)	7,67 (2,82)	6,10 (2,84)	2,74 (2,81)
<i>Ny. antunesi</i>	M	27,83 (1,76)	0,32 (2,27)	0,21 (2,48)	0,46 (1,80)
	F	20,10 (1,76)	1,60 (1,89)	1,50 (1,87)	0,97 (1,74)
<i>Ny. whitmani</i>	M	53,56 (2,77)	1,69 (2,81)	0,52 (3,03)	0,50 (2,76)
	F	40,01 (2,76)	2,72 (2,79)	2,11 (2,83)	1,96 (2,68)

Ainda nesta espécie, não houve diferença significativa entre os efeitos dos atrativos LL e BGS ($p=0,549$) e apenas uma ligeira indicação de diferença do BGL ($p=0,097$), mas existe uma ligeira evidência de que a taxa de captura de BGL é maior que as taxas de captura de LL e BGS (Tabela 5). Uma comparação entre os efeitos BGL e BGS, refazendo o modelo com BGL como referência, resultou em diferença significativa ($p=0,0188$) com um intervalo de confiança de 1.101 - 2.895 para a razão entre as capturas nos dois atrativos. Com relação à interação entre sexo×local, pode-se concluir que a proporção das taxas de captura de fêmeas e machos no local W1 foi menor em comparação com os outros locais, sendo este resultado significativo para W3 e P1 (Figura 8B).

Tabela 5. Análise dos fatores de efeito fixo influenciando na distribuição do número de indivíduos capturados em três espécies de flebotomíneos em Assis Brasil, Acre. Análises usando o Modelo Linear Generalizado Misto com função de ligação log as distribuições Poisson (*Pi. nevesi*) e Binomial negativo (*Ny. whitmani* e *Ny. antunesi*). Fonte: Próprio autor

Espécies	Parâmetros	Estimativa	SE	Valor- z	P (> Z)
<i>Pintomyia nevesi</i>	(Intercepto)	0.9874	0.404	2.444	0.0145
	W2	0.8315	0.3651	2.277	0.0228
	W3	-1.0974	0.5355	-2.049	0.0404
	P1	-1.7465	0.4093	-4.267	<0,0001
	Fêmeas	1,5622	0.1242	12.576	<0,0001
	W2xfêmeas	-1.487	0.2124	-7.002	<0,0001
	W3xfêmeas	0.3657	0.3932	0.93	0.3524
	P1xfêmeas	-0.2026	0.283	-0.716	0.4741
<i>Nyssomyia whitmani</i>	(Intercepto)	3.0842	0.4823	6.395	<0,0001
	W2	-2.5092	0.5628	-4.459	<0,0001
	W3	-3.8022	0.7255	-5.241	<0,0001
	P1	-4.1139	0.5081	-8.097	<0,0001
	Fêmeas	-0.2899	0.341	-0.85	0.39529
	Atrativo BGL	0.4214	0.2539	1.66	0.096968
	Atrativo BGS	-0.1581	0.264	-0.599	0.549222
	W2xfêmeas	0.7634	0.5775	1.322	0.186162
	W3xfêmeas	1.681	0.7084	2.373	0.017644
	P1xfêmeas	1.6583	0.5037	3.292	0.000993
<i>Nyssomyia antunesi</i>	(Intercepto)	3.2306	0.367	8.803	<0,0001
	W2	-4.4556	0.7795	-5.716	<0,0001
	W3	-4.8446	0.8741	-5.542	<0,0001
	P1	-4.0594	0.5323	-7.626	<0,0001
	Fêmeas	-0.3254	0.3693	-0.881	0.3782
	W2xfêmeas	1.9227	0.8158	2.357	0.0184
	W3xfêmeas	2.3032	0.9138	2.52	0.0117
	P1xfêmeas	1.0825	0.5415	1.999	0.0456

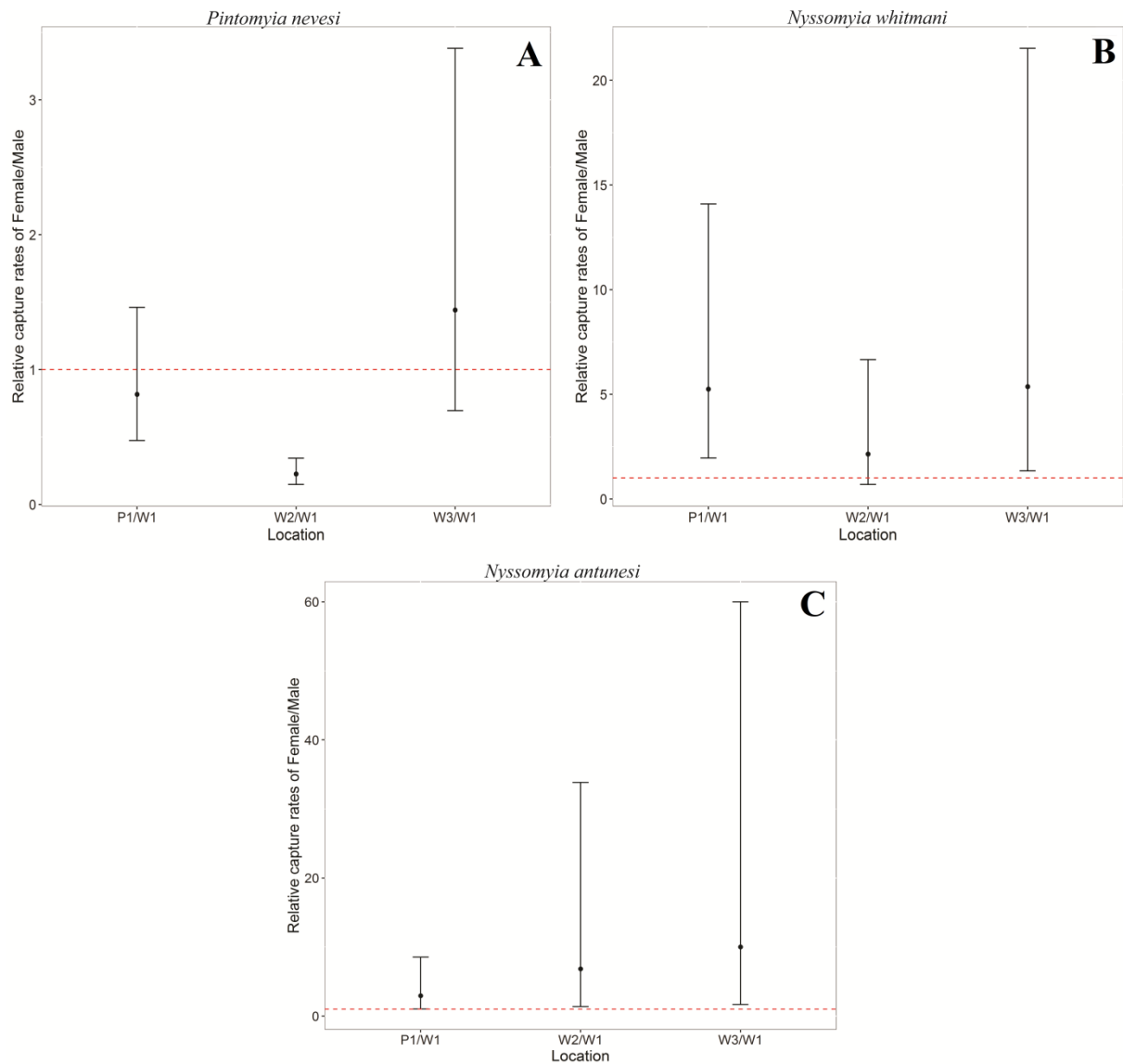
Figura 7. Box-plots para abundância (escala log) de machos e fêmeas de *Pi. nevesi* (A), *Ny. whitmani* (B), *Ny. antunesi* (C) capturados por local e tipo de atrativo. Linha em negrito: mediana; Círculo aberto: valores extremos. Fonte: Próprio autor



Para *Ny. antunesi* o padrão de abundância foi muito semelhante às outras duas espécies como apresentado na Figura 7C e o MLGM com distribuição Binomial Negativa e com função de ligação log. A interação entre sexo×local foi significativa ($p=0,0088$) e não houve interação entre sexo e atrativo ($p=0,932$). O efeito principal do atrativo também não foi significativo ($p=0,249$) (Tabela 3). A eliminação dos termos não significativos do modelo resultou em um novo modelo (Tabela 5). A proporção de taxas de captura de fêmeas e machos no local W1 foi menor em comparação com os outros três locais (Figura 8C).

O Código R utilizado para verificar o ordenamento das espécies e para o ajuste do modelo linear generalizado misto, esta detalhado no apêndice (apêndice 1 e 2).

Figura 8. Taxas de captura relativas de fêmeas versus machos para os locais W2, W3 e P1 com relação a W1, para *Pi. nevesi* (a), *Ny. whitmani* (b) *Ny. antunesi* (c), intervalo de confiança 95%.



5. DISCUSSÃO

Mesmo amostrado em um curto período de tempo, a diversidade de espécies de flebotomíneos foi alta e está de acordo com estudos anteriores realizados no mesmo município (Teles et al., 2016; Borges et al., 2017; Ávila et al., 2018; Ortiz et al., 2018). Das 39 espécies capturadas, as seis espécies que a seguir destacam-se pela importância epidemiológica devido ao seu papel como vetores de *Leishmania* spp: *Bichromomyia flaviscutellata* - *Leishmania* (L.) *amazonensis*, (Lainson & Shaw, 1968); *Migonemyia migonei* - L. (V.) *braziliensis* (Pita-Pereira et al., 2005), *Thrichophoromyia auraensis*, - L. (V.) *braziliensis*, L.(V.) *Lainsoni* and L. (V.) *guyanensis* (Valdivia et al., 2012; Teles et al., 2016; Araujo-Pereira et al., 2017), *Psychodopygus davisi* - L.(V.) *braziliensis* (Grimaldi et al., 1991) and L. (V.) *naiffi* (Gil et al., 2003), *Ny whitmani* - L.(V.) *braziliensis* (Souza et al., 2002) and L.(V.) *shawi* (Rangel & Lainson, 2009), *Ny antunesi* – L.(V.) *lindenbergi* (Silveira et al., 2002).

A baixa densidade dessas espécies vetorais impossibilitou uma adequada comparação entre os atrativos avaliados. Um maior número de capturas em diferentes períodos do ano poderia aumentar a robustez dos dados e, consequentemente, as análises para essas espécies.

Ressalta-se que *Ny. whitmani* e *Ny. antunesi* foram ao mesmo tempo as espécies mais abundantes na área de floresta secundária residual com considerável ação antropogênica (W1). Essa relação entre essas espécies vetorais e o ambiente antropogênico já foi apontada por outros autores (Azevedo et al., 2008; Rangel et al., 2014).

Uma metodologia considerada mais adequada para medir o comportamento antropofílico é avaliar o número de insetos coletados em iscas humanas em comparação com outras iscas e armadilhas luminosas (Campbell, 1999). E, sob essa perspectiva, foi pensada a utilização das iscas comerciais desse trabalho, uma vez que se trata de uma mistura de compostos atrativos para espécies de culicídeos consideradas antropofílicas. No entanto, as três espécies mais abundantes coletadas apresentam diferentes graus de antropofilia segundo diferentes autores e metodologias. Dados da literatura apontam que fêmeas de *Ny. antunesi* e *Pi. nevesi* são antropofílicas (Rangel & Lainson, 2009; Galati, E.A. comunicação pessoal). *Nyssomyia whitmani* é considerada um complexo de espécies crípticas, que apresenta uma ampla plasticidade comportamental, geralmente considerada silvestre ou zoofílica na região amazônica e peridomiciliar ou antropofílica na região sul do Brasil (Ready, P.D., 2011). Não obstante, algumas populações amazônicas exibem características fortemente antropofílicas (Campbell-Lendrum et al., 1999). No estado do Acre, *Ny. whitmani* e *Ny. antunesi* estão

implicadas como vetores de *Leishmania* spp. em ambientes antropizados (Azevedo et al., 2008).

Os resultados apresentados mostraram respostas diferentes para as três espécies mais abundantes coletadas com os atrativos avaliados. Apenas para *Ny. whitmani* houve uma ligeira indicação de atratividade para um dos atrativos avaliados ($p=0.0497$). Para *Ny. antunesi* e *Pi. nevesi* não houve indicação de atratividade em comparação com a armadilha controle de luz. BGL induziu um aumento nas capturas de *Ny. whitmani*, enquanto as armadilhas com o atrativo BGS não o fizeram. Apesar de haver uma leve diferença estatística quando os quatro ambientes foram avaliados conjuntamente ($p=0,09$), W1 e W2 apresentaram maiores capturas de machos e fêmeas de *Ny. whitmani* com BGL do que armadilhas iscadas com BGS e a armadilha luminosa sem nenhum atrativo.

Esse fato é interessante, pois ambos atrativos possuem a mesma composição química e a diferença no efeito de atração pode ser uma consequência do tipo de dispensador usado. O BG-Lure é um cartucho de plástico e o BG-Sweetscent é um pacote à prova de água. Ambos os atrativos apresentaram perdas à medida que derretiam, provavelmente como consequência dos efeitos da alta umidade e temperatura, próprios da região amazônica. Este fato poderia comprometer a eficácia e a vida útil do produto nestes ambientes, por isso, cada atrativo foi utilizado apenas por três dias consecutivos nas rotações das armadilhas 3×3; após esse período, as iscas foram substituídas por novas.

Em um estudo anterior em campo foi observado que armadilhas luminosas iscadas com BGL aumentaram a captura de *Lu. longipalpis*, com maior número de machos do que fêmeas. Entretanto, para *Ny. intermedia* o atrativo BGL não aumentou o número de indivíduos capturados e não houve diferenças na razão entre os sexos, quando comparados com a armadilha luminosa controle (Andrade et al., 2008).

Uma possibilidade para aumentar as respostas dos flebotomíneos para esses atrativos seria a adição de dióxido de carbono (CO_2). Sabe-se que o CO_2 atua tanto na ativação quanto na atração de insetos hematófagos (Gillies et al., 1980; Gibson & Torr, 1999). Vários estudos de campo e semi-campo mostraram que os flebotomíneos são atraídos pelas armadilhas luminosas tipo CDC iscadas com gelo seco (Knudsen et al, 1979; Chaniotis, 1983; Alexander, 2000; Kasili et al., 2009). Para a espécie *Phlebotomus papatasi*, o CO_2 aumentou as taxas de captura quando comparado ao 1-octen-3-ol (Beavers et al., 2004) e, armadilhas comerciais para culicídeos iscadas com CO_2 capturaram mais indivíduos quando comparadas com armadilhas luminosas tipo CDC (Hoel et al., 2010). Para as espécies de flebotomíneos neotropicais *Ny. whitmani* e *Ny. intermedia* o CO_2 , liberado na mesma proporção que um ser

humano, atraiu 46% e 44%, respectivamente, dos insetos coletados com os todos os compostos voláteis emitidos por um ser humano (Pinto et., 2001).

Outra hipótese possível para explicar porque espécies consideradas antropofílicas, como *Ny. antunesi* e *Pi. nevesi*, não responderam fortemente às iscas avaliadas pode ser os cairomônios utilizados (ácido láctico, amônia e ácido capróico) ou, que a concentração e proporção entre eles não sejam convenientes para estas espécies (Bosh et al, 2000). Para culicídeos, essas diferenças nas respostas aos odores humanos foram observadas. Melhores respostas foram registradas usando amônia, ácido láctico e dois ácidos carboxílicos para *A. aegypti* (Bosh et al, 2000); amônia, ácido láctico e sete ácidos carboxílicos para *A. gambiae* (Smallegange et al, 2009) e ácido láctico, ácidos carboxílicos e aldeídos para *C. quinquefasciatus* (Allan et al, 2006).

Existem poucos estudos relacionados a compostos orgânicos voláteis isolados de seres humanos que atuem como atrativos para os flebotomíneos. Para fêmeas de *Ny intermedia*, os seguintes compostos isolados em pelos retirados da pele humana apresentaram resposta positiva de atração em experimento em túnel de vento: 2-fenilacetaldeído, 6-metil-5-heptenona, eicosano e nonadecano (Tavares et al., 2018). Mais pesquisas de laboratório e campo precisam ser conduzidas para avaliar quais compostos, presentes na transpiração ou respiração de seres humanos, podem atuar como cairomônios para os flebotomíneos.

6. CONCLUSÕES

Dentre os dois atrativos comerciais avaliados em associação com a luz, o BG-Lure mostrou alguma possibilidade de utilização quando comparado ao BG-Sweetscent.

A isca BG-Lure associada à luz mostrou-se com uma potencial ferramenta para incrementar as capturas de *Ny. whitmani*. Uma possibilidade para aumentar a performance do BG-Lure na captura de *Ny. whitmani*, ou outras espécies de flebotomíneos, seria a adição de CO₂ à essa isca.

DETECÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS EM MACHOS, FÊMEAS GRÁVIDAS E OVOS DE QUATRO ESPÉCIES DE FLEBOTOMÍNEOS UTILIZANDO MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA ACOPLADA À CROMATOGRAFIA GASOSA - ESPECTROMETRIA DE MASSAS (SPME/GC-MS).

RESUMO

Existem cerca de 570 flebotomíneos identificados na América do Sul e pouco mais de 20 espécies são vetoras de 18 espécies de *Leishmania* para humanos. Estudos em ecologia química de flebotomíneos são focados principalmente na espécie *Lutzomyia longipalpis* vector principal nas Américas do protozoário parasita *Leishmania infantum*, agente etiológico da leishmaniose visceral. *Lu. longipalpis* é considerada um complexo de espécies em que os machos produzem cinco diferentes tipos de feromônios sexual. Em fêmeas dessa espécie, foi identificado também o ácido dodecanóico, feromônio de oviposição produzido pelas glândulas acessórias das fêmeas grávidas. A metodologia mais utilizada em estudos de feromônios sexuais e oviposição em flebotomíneos é baseada na extração direta em hexano. Este estudo tem como objetivo central investigar por meio de ensaios comportamentais e químicos a presença de feromônios sexual e oviposição em flebotomíneos das espécies, *Nyssomyia neivai*, *Nyssomyia whitmani*, *Pintomyia fischeri* e *Migonemyia migonei* utilizando a técnica de extração em fase sólida (SPME) como método alternativo à extração com solventes. A espécie *Lu. longipalpis* foi utilizada no presente estudo para auxiliar a padronização da metodologia. O perfil dos compostos voláteis liberados por machos, fêmeas grávidas e ovos foram analisadas *in vivo* e sob aquecimento usando a Microextração em Fase Sólida em Headspace (HS-SPME) ou em contato com a amostra (contato-SPME), seguida de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC/MS). Diferentes parâmetros foram avaliados, como tipo de revestimento das fibras, tamanho do recipiente, condições de amostragem, tempo de extração, número de machos, fêmeas ou ovos, utilizando *Lu. longipalpis* como controle positivo. A fibra escolhida foi Divinilbenzeno-Carboxen-Polidimetilsiloxano (DVB-CAR-PDMS, 50/30 µm). Foram realizadas análises comportamentais para avaliar a resposta de fêmeas grávidas a ovos coespecíficos e ao ácido dodecanóico através de ensaios em arenas contendo dois tratamentos, teste e controle. O SPME demonstrou ser altamente eficaz na coleta de compostos voláteis em flebotomíneos. Ao todo, 16 compostos foram detectados entre machos, fêmeas grávidas e ovos das espécies avaliadas. Os compostos voláteis mais comuns foram os aldeídos, 60%; cetonas, 15%; ésteres 10%, terpenos 10% e ácidos graxos 5%. Dois compostos que se destacaram foram o nonanal, presente em fêmeas e ovos de todas as espécies e o ácido dodecanóico, identificado como feromônio de oviposição em *Lu. longipalpis*, que foi detectado em fêmeas e ovos de *Ny. whitmani*, *Pi. fischeri* e *Mg. migonei*. Na espécie *Ny. neivai* apenas traços de ácido dodecanóico foram detectados em grandes quantidades de ovos (855); além disso, em ensaios biológicos as fêmeas não foram atraídas significativamente para esse composto. Em machos, foram identificados apenas oito compostos, seis aldeídos (75%) e dois terpenos (25%), sendo o nonanal comum a todas as espécies. Para *Lu. longipalpis*, foi possível detectar o feromônio sexual, 9-metilgermacreno-B; observando-se diferenças nos padrões de liberação e conteúdo total deste feromônio entre indivíduos da mesma idade. Em *Mg. migonei* foi possível detectar em machos, provenientes de campo, um composto de massa molar 218 (MM=218) com 76% de similaridade com germacrona.

Palavras chaves: flebotomíneos, micro-extração em fase sólida; cromatografia gasosa, ácido dodecanóico, nonanal, 9-metilgermacreno-B.

DETECTION OF VOLATILE COMPOUNDS FROM MALES, PREGNANT FEMALES AND EGGS OF FOUR SAND FLY SPECIES USING SOLID PHASE MICROEXTRACTION- GAS CHROMATOGRAPHY- MASS SPECTROMETRY (SPME/GC-MS).

ABSTRACT

There are about 570 sandflies identified in South America and about 20 species are vectors of 18 species of *Leishmania* to human beings. Chemical ecology studies in sand flies are mainly focused on *Lutzomyia longipalpis* the main vector of the protozoan parasite *Leishmania infantum*, etiological agent of visceral leishmaniasis in the Americas. *Lutzomyia longipalpis* is considered a complex of species in which males produce five different types of sex pheromones. In females of this species, dodecanoic acid, the oviposition pheromone produced by the accessory glands of pregnant females, was also identified. The most common methodology used in studies of sexual pheromones and oviposition in sandflies is based on the direct extraction in hexane. The aim of this study is to investigate the presence of sex and oviposition pheromones in sandflies of the species *Nyssomyia neivai*, *Nyssomyia whitmani*, *Pintomyia fischeri* and *Migonemyia migonei* using the solid phase extraction technique (SPME) as a method alternative to solvent extraction. The species *Lu. longipalpis* was used in the present study to aid the standardization of the methodology. The volatile compounds released by males, pregnant females and eggs were analyzed *in vivo* and under heating using Headspace Solid Phase Microextraction (HS-SPME) or in contact with the sample (SPME-contact), followed by coupled Gas Chromatography to Mass Spectrometry (GC/MS). Different parameters were evaluated, such as fiber coating type, vessel size, sampling conditions, extraction time, number of males, females or eggs, using *Lu. longipalpis* as positive control. The chosen fiber was Divinylbenzen-Carboxen-Polydimethylsiloxane (DVB-CAR-PDMS, 50/30 μm). Behavioral analyzes were performed to evaluate pregnant females responses to co-specific eggs and dodecanoic acid in bioassays containing two treatments, test and control. SPME was highly effective in the collection of volatile compounds in sand flies. In total, 16 compounds were detected among males, pregnant females and eggs of the evaluated species. The most common volatile compounds were aldehydes, 60%; ketones, 15%; esters, 10%, terpenes, 10% and fatty acids 5%. Two compounds that stood out were the nonanal, present in females and eggs of all species and dodecanoic acid, identified as oviposition pheromone in *Lu. longipalpis*, which was detected in females and eggs of *Ny. whitmani*, *Pi. fischeri* and *Mg. migonei*. For *Ny. neivai* only traces of dodecanoic acid were detected in large quantities of eggs (855). Furthermore, in biological assays, *Ny. neivai* females were not attracted significantly to that compound. In males, only eight compounds, six aldehydes (75%) and two terpenes (25%) were identified, the nonanal being common to all species. For *Lu. longipalpis*, it was possible to detect the sexual pheromone, 9-methylgermacrene-B; observing differences in pheromone release patterns and variation in pheromone content among individuals of the same age. In *Mg. migonei* it was possible to detect in males, from the field, an unknown compound (MM=218) which presented 76% of similarity with germacrone.

Key-words: phlebotomine; Solid phase microextraction; Gas chromatography, dodecanoic acid, Nonanal, 9-Methylgermacrene-B

1. INTRODUÇÃO

1.1. FEROMÔNIOS SEXUAIS EM FLEBOTOMÍNEOS

As pesquisas sobre feromônios em flebotomíneos são em sua grande maioria centradas em *Lutzomyia longipalpis*, sendo que a origem desses estudos surgiu a partir da observação de diferenças morfológicas entre machos (Mangabeira 1969). Tal observação gerou a hipótese da existência de subpopulações em *Lu. longipalpis* e, a verificação deste fato desencadeou os avanços nessa área, ao ponto de atualmente existirem tentativas de utilização de armadilhas utilizando iscas com feromônio sexual sintético para o controle dessa espécie (Bray et al. 2009, Bray et al. 2010, Bray et al. 2014a).

A primeira suspeita que *Lu. longipalpis* seria um complexo de espécies foi registrada por Mangabeira em 1969, sendo essa suposição baseada a partir das diferenças no número de áreas mais claras chamadas de manchas abdominais observadas nos machos da região norte do Brasil. Com relação ao fenótipo, foi observado que em machos capturados no estado do Pará existia um único par de manchas (1S) no quarto tergito e os machos capturados no Ceará apresentavam dois pares de manchas abdominais (2S), no quarto e no terceiro tergitos. Levantou-se então a hipótese da existência de duas espécies ou de subespécies (Mangabeira 1969). Em 1983, foi realizado um estudo de cruzamento entre machos e fêmeas das duas formas (1S e 2S). Nesse ensaio os machos não foram capazes de inseminar fêmeas alopátricas do mesmo fenótipo (1S x 1S), nem fêmeas simpátricas de fenótipos diferentes (1S x 2S), sugerindo a existência de mais de dois tipos de subespécies, ou de um complexo de espécies (Ward et al. 1983).

Um ano mais tarde, em 1984, a morfologia externa das manchas abdominais foi examinada através de microscopia eletrônica de varredura. Foram observadas pequenas estruturas chamadas de pápulas, ou glândulas odoríferas (Barth 1961), que apresentavam um poro central, atribuindo-lhes um papel na secreção de feromônios; diferenças no formato e quantidade das pápulas nos dois morfotipos foram também observadas (Sobral 2S: convexa, hemisféricas; Lapinha 1S: planas) (Lane and Ward 1984). Posteriormente, observou-se a conformação interna das glândulas, sendo formadas por grandes células colunares, com um reservatório central conectado por meio de um pequeno ducto ao poro das pápulas (Lane and Bernardes 1990).

Para a caracterização dos compostos liberados através das pápulas em *Lu. longipalpis* foi realizada a extração em solventes. Foram submersos em hexano, o quarto tergito abdominal de machos da Lapinha, MG (1S) e o terceiro e quarto tergitos abdominais dos

insetos da Morada Nova, CE (2S). A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas permitiu a identificação de dois compostos: uma molécula similar ao homofarneseno ($C_{15}H_{24}$) na população de Lapinha, e outra molécula diterpenóide na população de Morada Nova ($C_{20}H_{32}$) (Lane et al. 1985). Porém, outro estudo realizado em quatro populações distintas: Sobral (1S), Sobral (2S), Marajó (1S) e Santarém (1S) demonstrou não haver correlação entre número de manchas e tipo de feromônio produzido, pois Marajó e Santarém produziram diterpenos, mesmo ambas possuindo um par de manchas (Phillips et al. 1986).

Na tentativa de evidenciar uma provável atividade biológica dos extratos dos tergitos glandulares dos machos, experimentos comportamentais utilizando fêmeas virgens de *Lu. longipalpis* foram realizados em olfatômetro. Como resultado foi observado um maior número de fêmeas atraídas para hospedeiros apresentados junto com extratos de glândulas dos machos, do que quando o hospedeiro era apresentado isoladamente (Morton and Ward 1989a, b). Resultados similares foram obtidos em que fêmeas virgens foram atraídas para a combinação dos extratos glandulares com urina de hamster, CO_2 e calor; estes estímulos, quando oferecidos de maneira individual, ou na ausência dos extratos, não exerceram nenhum tipo de atratividade sobre os insetos (Nigam and Ward 1991).

Os extratos dos tergitos glandulares de *Lu. longipalpis* oriundos de Jacobina, BA foram fracionados mediante cromatografia líquida de alta performance (HPLC), permitindo a separação e avaliação de cada um dos compostos presentes nas frações. Estas frações foram avaliadas em bioensaios de atratividade com fêmeas virgens, permitindo identificar os compostos ativos para cada uma das populações (Hamilton et al. 1994).

Atualmente, existem pelo menos cinco populações de *Lu. longipalpis* isoladas reprodutivamente, produzindo cada uma delas seus próprios feromônios. A seguir cada quimiotipo com sua primeira detecção são descritos: quimiotipo 1: 9-metil-germacreno-B encontrado em machos de *Lu. longipalpis* da caverna de Lapinha-MG (Hamilton et al. 1996c, Hamilton et al. 1999a); quimiotipo 2: 3-metil-himachaleno identificado na população de Jacobina na Bahia (Hamilton et al. 1996a); quimiotipo 3: Cembreno-1 em Sobral, Santarém, Estrela de Alagoas e Sol do Costa, Ceará (Brazil and Hamilton 2002), quimiotipo 4: Cembreno-2 em Jaíba, Minas Gerais. (Hamilton et al. 2004) e o quimiotipo 5: 9-metilgermacreno- B^+ . Este último diferencia-se do quimiotipo 1 pela proporção dos terpenos produzidos e pelas características morfológicas dos insetos (Hamilton et al. 2005). Os dois primeiros quimiotipos, 9-metil-germacreno-B e 3-metil-himachaleno foram sintetizados (Hamilton et al. 1999c, Muto et al. 1999, Kurosawa and Mori 2000, Hooper et al. 2006). Algumas iscas com 9-metil-germacreno-B foram desenvolvidas e utilizadas em campo;

atraindo maior número de machos e fêmeas para os locais com a presença do feromônio sintético do que para as armadilhas controle (Bray et al. 2009, Bray et al. 2010, Bray et al. 2014a).

Com relação às outras espécies de flebotomíneos, o conhecimento sobre feromônios ainda é incipiente quando comparado com *Lu. longipalpis*. Através da microscopia eletrônica diferentes formatos de pápulas foram descritos em aproximadamente 60 espécies de flebotomíneos, nem sempre associadas às manchas claras sobre os tergitos abdominais, como em *Lu. longipalpis* (Ward et al. 1991, Ward et al. 1993, Spiegel et al. 2002, Serrano et al. 2016).

Um resumo das espécies de flebotomíneos investigadas com relação à presença de pápulas e feromônios sexuais é apresentado na Tabela 1.

Considerando o acima exposto, no presente trabalho foram estudadas duas espécies que apresentam pápulas (*Pi. fischeri* e *Mg. migonei*) e duas espécies sem a presença de pápulas (*Ny. neivai* e *Ny. whitmani*).

Estas quatro espécies são amplamente distribuídas no Brasil e agem como vetoras, incriminadas ou suspeitas, na transmissão da *Leishmania braziliensis*. Além disso *Ny. whitmani* também é incriminada na transmissão de *Leishmania shawi* (Rangel et al., 2018); agentes etiológicos da leishmaniose tegumentar. Por outro lado, *Mg. migonei* e *Pi. fischeri* são respectivamente vetores, comprovados e suspeitos, na transmissão de *Leishmania infantum*.

Tabela 1. Resumo das estruturas, compostos e evidência comportamental de feromônio sexual em machos de flebotomíneos.

Gênero	Espécie	Pápula	Composto principal	Glândula	Evidência comportamental	Referências
Espécies do Novo Mundo						
<i>Bichromomyia</i>	<i>flaviscutellata</i> (Mangabeira, 1942)	sim	-			Ward et al., 1993
	<i>olmea-bicolor</i> (Fairchild & Theodor, 1971)	sim	-			Ward et al., 1993
<i>Brumptomyia</i>	<i>cardosoi</i> (Barretto & Coutinho, 1941)	sim	-			Galati, E.A.B., 1990
	<i>brumpti</i> (Larrousse, 1920)	não	-			Galati, E.A.B., 1990
<i>Evandromyia</i>	<i>brachyphalla</i> (Mangabeira, 1941)	sim	-			Ward et al., 1993
	<i>carmelinoi</i> (Ryan, Fraiha, Lainson & Shaw, 1986)	sim	Sesquiterpeno	sim		Hamilton et al., 2002; Spiegel et al., 2002
	<i>cortelezzii</i> (Brèthes, 1923)	sim	-			Galati, E.A.B., 1990
	<i>dubitans</i> (Sherlock, 1962)	sim	-			Ward et al., 1993
	<i>evandroi</i> (Costa Lima & Antunes, 1936)	sim	Nenhum			Ward et al., 1993; Hamilton et al., 2002
	<i>infraspinosa</i> (Mangabeira, 1941)	sim	-			Galati, E.A.B., 1990; Ward et al., 1993
	<i>lenti</i> (Mangabeira, 1938) (Baturité)	sim	Nenhum			Ward et al., 1993; Hamilton et al., 2002
	<i>lenti</i> (Mangabeira, 1938) (Betim)	sim	Diterpeno	sim		Hamilton et al., 2002; Spiegel et al., 2002
	<i>monstruosa</i> (Floch & Abonnenc, 1944)	sim	-			Galati, E.A.B., 1990; Ward et al., 1993
	<i>rupicola</i> (Martins, Godoy & Silva, 1962)	sim	-			Galati, E.A.B., 1990
	<i>sallesi</i> (Galvão & Coutinho, 1939)	sim	-			Ward et al., 1993
	<i>saulensis</i> (Floch & Abonnenc, 1944)	sim	-			Galati, E.A.B., 1990; Ward et al., 1993
	<i>walkerii</i> (Newstead, 1914)	sim	-			Galati, E.A.B., 1990; Ward et al., 1993
<i>Lutzomyia</i>	<i>bifoliata</i> (Osorno-Mesa, Morales, Osorno & Hoyos, 1970)	sim	-			Lane e Bernardes, 1990
	<i>cavemicola</i> (Costa Lima, 1932)	sim	-			Galati, E.A.B., 1990
	<i>cruciata</i> (Coquillett, 1907)	sim	Sesquiterpeno	sim	sim	Galati, E.A.B., 1990; Serrano et al., 2016
	<i>cruzi</i> (Mangabeira, 1938)	sim	9-metilgermacreno-B	sim	sim	Barth, 1961; Galati, E.A.B., 1990; Lane e Bernardes, 1990; Spiegel et al., 1998; Brazil e Hamilton, 2002; Spiegel et al., 2004
	<i>gomezi</i> (Nitzulescu, 1931)	sim	-			Ward et al., 1993
	<i>ischnacantha</i> (Martins, Souza & Falcão, 1962)	sim	-			Lane e Bernardes, 1990
	<i>ischyracantha</i> (Martins, Falcão & Silva, 1962)	sim	-			Lane e Bernardes, 1990
	<i>lichyi</i> (Floch & Abonnenc, 1950)	sim	Homosesquiterpeno			Lane e Bernardes, 1990; Hamilton et al., 1999a

Tabela 1. Resumo das estruturas, compostos e evidência comportamental de feromônio sexual em machos de flebotomíneos.

Gênero	Espécie	Pápula	Composto principal	Glândula	Evidência comportamental	Referências
<i>Lutzomyia</i>	<i>longipalpis complex</i> (Lutz & Neivai, 1912)	sim	9-metilgermacreno-B; 3-metil- α -himachaleno; Cembreno-1; Cembreno-2; 9-metilgermacreno-B ⁺	sim	sim	Lane e Ward, 1984; Phillips et al., 1986; Hamilton et al., 1996 a, b; Brazil and Hamilton, 2002; Hamilton et al., 2004; Hamilton et al., 2005; Bray and Hamilton, 2007; Araki et al., 2009
	<i>peruensis</i> (Shannon, 1929)	sim	-			Ward et al., 1993
	<i>tejadai</i> (Galati & Cáceres, 1990)	sim	-			Hamilton et al., 2002
	<i>renei</i> (Martins, Falcão & Silva, 1957)	não	Nenhum	sem estrutura	-	Ward et al., 1993; Hamilton et al., 1999c
<i>Micropygomyia</i>	<i>cayennensis cayennensis</i> (Floch & Abonnenc, 1941)	sim	-			Galati, E.A.B., 1990
	<i>chiapanensis</i> (Dampf, 1947)	sim	-			Galati, E.A.B., 1990
	<i>quinquefer</i> (Dyar, 1929)	sim	-			Barth, 1961; Ward et al., 1993
	<i>rorotaensis</i> (Floch & Abonnenc, 1944)	sim	-			Ward et al., 1993
	<i>trinidadensis</i> (Newstead, 1922)	sim	-			Ward et al., 1993
	<i>venezuelensis</i> (Floch & Abonnenc, 1948)	sim	-			Ward et al., 1993
	<i>yencanensis</i> (Ortiz, 1965)	sim	-			Ward et al., 1993
<i>Migonemyia</i>	<i>migonei</i> (França, 1920)	sim	Nenhum			Ward et al., 1993; Hamilton et al., 2002
<i>Nyssomyia</i>	<i>antunesi</i> (Coutinho, 1939)	não	-			Ward et al., 1993
	<i>whitmani</i> (Antunes & Coutinho, 1939)	não	Nenhum			Hamilton et al., 2002
	<i>neivai</i> (Pinto, 1926)	não	Nenhum			Hamilton et al., 2002
<i>Pintomyia</i>	<i>evansi</i> (Nuñez-Tovar, 1924)	sim	-			Galati, E.A.B., 1990; Ward et al., 1993
	<i>fischeri</i> (Pinto, 1926)	sim	-			Galati, E.A.B., 1990; Ward et al., 1993
	<i>monticola</i> (Costa Lima, 1932)	sim	-			Galati, E.A.B., 1990; Ward et al., 1993
	<i>ovallesi</i> (Ortiz, 1952)	sim	-			Ward et al., 1993
	<i>pressoai</i> (Coutinho & Barretto, 1940)	sim	Diterpeno			Ward et al., 1993; Hamilton e Ward 1994
	<i>rangeliana</i> (Ortiz, 1953)	sim	-			Ward et al., 1993
	<i>serrana</i> (Damasceno & Arouck, 1949)	sim	-			Galati, E.A.B., 1990
	<i>damascenoi</i> (Mangabeira, 1941)	sim	-			Ward et al., 1993
	<i>verrucarum</i> (Townsend, 1913)	sim	-			Ward et al., 1993
	<i>nuneztovari</i> (Ortiz, 1954)	não	-			Ward et al., 1993

Tabela 1. Resumo das estruturas, compostos e evidência comportamental de feromônio sexual em machos de flebotomíneos.

Gênero	Espécie	Pápula	Composto principal	Glândula	Evidência comportamental	Referências
<i>Pintomyia</i>	<i>spinicrassa</i> (Morales, Osorno-Mesa, Osorno & Hoyos, 1969)	não	-			Ward et al., 1993
	<i>townsendi</i> (Ortiz, 1959)	não	-			Ward et al., 1993
	<i>youngi</i> (Feliciangeli & Murillo, 1985)	não	-			Ward et al., 1993
<i>Psathyromyia</i>	<i>brasiliensis</i> (Costa Lima, 1932)	não	-			Ward et al., 1993
<i>Psychodopygus</i>	<i>davisi</i> (Root, 1934)	não	-			Ward et al., 1993
	<i>leonidasdeanei</i> (Fraiha, Ryan, Ward, Lainson & Shaw, 1986)	não	-			Ward et al., 1993
	<i>panamensis</i> (Shannon, 1926)	não	-			Ward et al., 1993
	<i>squamiventris maripaensis</i> (Floch & Abonnenc, 1946)	não	-			Ward et al., 1993
<i>Trichophoromyia</i>	<i>brachipyga</i> (Mangabeira, 1942)	não	-			Ward et al., 1993
	<i>ubiquitalis</i> (Mangabeira, 1942)	não	-			Ward et al., 1993
<i>Trichopygomyia</i>	<i>dasypodogeton</i> (Castro, 1939)	sim	-			Ward et al., 1993
<i>Viannamyia</i>	<i>tuberculata</i> (Mangabeira, 1941)	sim	-			Ward et al., 1993
	<i>furcata</i> (Mangabeira, 1941)	sim	-			Ward et al., 1993
Espécies do Velho Mundo						
<i>Phlebotomus</i>	<i>ariasi</i> (Tonnoir, 1921)	não	-			Ward et al., 1993
	<i>argentipes</i> (Annandale & Brunetti, 1908)	não	-			Ward et al., 1993; Bray et al., 2014
	<i>chabaudi</i> (Croset, Abonnenc & Rioux, 1970)	não	-			Ward et al., 1993
	<i>dubosqi</i> (Nevue-Lemaire, 1906)	não	-			Ward et al., 1993
	<i>neglectus</i> (Tonnoir, 1921)	não	-			Ward et al., 1993
	<i>perfiliewi</i> (Parrot, 1930)	não	-			Ward et al., 1993
	<i>perniciosus</i> (Newstead, 1911)	não	-			Ward et al., 1993
	<i>papatasi</i> (Scopoli, 1786)	não	-		sim	Chelbi et al., 2011; Chelbi et al., 2012

1.2. FEROMÔNIO DE OVIPOSIÇÃO EM FLEBOTOMÍNEOS

Em flebotomíneos, o pesquisador inglês Robert Killick-Kendrick foi o primeiro a sugerir a existência de um feromônio de oviposição, baseado nas observações em *Phlebotomus ariasi*, que apresentava certa preferência de ovipor em locais onde já existissem outros estágios imaturos (Killick-Kendrick 1987). Este comportamento foi observado também em fêmeas grávidas de *Lu. longipalpis*, as quais ovipunham em locais com ovos coespecíficos (ElNaiem and Ward 1990). Verificou-se também que o número e idade dos ovos são cruciais para elucidar uma resposta significativa em fêmeas grávidas. Com 20 ou 40 ovos no recipiente, não foi observada uma maior oviposição em relação ao controle sem ovos. Somente acima de 80 ovos foi observada atratividade para a oviposição das fêmeas, a qual foi maior durante as primeiras 48 horas, mas manteve-se até o sexto dia. Além disso, os ovos perdiam atratividade quando lavados com solventes orgânicos (ElNaiem and Ward 1991).

A verificação da mediação química na oviposição foi realizada pouco tempo depois através de ensaios biológicos, em que fêmeas grávidas de *Lu. longipalpis* foram atraídas para locais com extratos hexânicos de ovos e glândulas acessórias de outras fêmeas grávidas. Dois compostos foram identificados por análises cromatográficas em ambos os extratos; tais compostos não apareceram em machos e nem fêmeas nas quais as glândulas acessórias foram removidas. Diante disto as glândulas acessórias foram apontadas como o local de produção e armazenamento de ambos os compostos que, por sua vez, envolveriam os ovos e desempenhariam um papel importante na atratividade para novas fêmeas grávidas (Dougherty et al. 1992). Ensaios de atratividade para cada um dos compostos verificaram que somente um deles seria responsável pela atração acima citada (Dougherty et al. 1994). Este composto foi identificado como ácido dodecanóico, molécula que seria metabolizada na glândula acessória a partir do ácido hexadecanóico, forma de armazenamento de energia, quatro dias após o repasto sanguíneo (Dougherty and Hamilton 1997).

Além do ácido dodecanóico, alguns substratos estimulantes para a oviposição em *Lu. longipalpis* foram identificados. Entre eles o substrato restante de antigas colônias, chamado *frass*, formado pela presença de fêmeas mortas, restos de alimentos parcialmente digeridos, detritos e/ou bactérias provenientes dos estádios imaturos e ração para as larvas. A ração de coelho, um dos componentes utilizados na ração de flebotomíneos, teve um efeito sinérgico junto ao ácido dodecanóico, melhorando a oviposição em fêmeas de *Lu. longipalpis* (ElNaiem and Ward 1992b, Dougherty et al. 1993). Outros cairomônios importantes, como hexanal e 2-metil-2-butanol, foram identificados em fezes de aves e coelhos sendo atrativos para fêmeas grávidas (Dougherty et al. 1995). A presença de diferentes microrganismos nas fezes de

coelho estimulou a oviposição das fêmeas de *Lu. longipalpis* e o desenvolvimento dos estádios larvais. Algumas destas bactérias, como *Rhizobium radiobacter*, contribuíram para a redução do tempo do ciclo biológico de *Lu. longipalpis* e passaram a fazer parte da microflora dos adultos (Peterkova-Koci et al. 2012).

O comportamento tigmotrópico foi constatado também em *Lu. longipalpis* e *Mg. migonei* (Nieves et al. 1997). Este comportamento se caracteriza pela preferência das fêmeas para ovipor em superfícies irregulares e fendas em vez de superfícies planas, imitando o comportamento natural destes insetos, visto que, os criadouros naturais são encontrados em fendas de árvores e raízes; ambientes escuros, úmidos e ricos em matéria orgânica (Elnaiem and Ward 1992a). Além dos fatores físicos, os fatores ambientais como temperatura e umidade aumentaram a oviposição e reduziram a mortalidade das fêmeas durante a oviposição.

Algumas respostas em comum com *Lu. longipalpis*, como a atratividade de fêmeas grávidas a substratos coespecíficos ou *frass*, foram identificadas em *Ph. argentipes* e *Ph. papatasi* (Wasserberg and Rowton 2011, Kumar et al. 2013). Em *Ph. papatasi*, as fêmeas grávidas responderam melhor a substratos com larvas do segundo ou terceiro estágio quando comparados aos substratos contendo larvas de quarto estágio ou pupas. Isto provavelmente devido aos compostos voláteis produzidos pelos microrganismos próprios, liberados nas fezes dessas fases imaturas (Marayati et al. 2015).

A resposta atrativa do ácido dodecanóico foi avaliada em *Lu. shannoni*. Entretanto, diferentemente de *Lu. longipalpis* esta espécie não respondeu a este composto nem a ovos coespecíficos (Mann and Kaufman 2010). Com o extrato hexânico de 1.000 ovos de *Lutzomyia renei* foi ligeiramente atrativo para fêmeas grávidas, sendo que alguns ácidos graxos insaturados (ácido hexadecenóico e octadecenóico) e saturados (ácido dodecanóico e ácido tetradecanóico) foram identificados em pequenas concentrações (Alves et al. 2003).

Um resumo das espécies de flebotomíneos investigadas com relação à presença de feromônios de oviposição é apresentado na Tabela 2.

Tabela 2. Resumo dos feromônios, cairomônios e substratos que atuam como atrativos ou estimulantes da oviposição em flebotomíneos.

Gênero	Espécie	Atratividade a ovos coespecíficos	Atratividade a substratos	Ferômonio oviposição	Cairomônios	Referências
Espécies do Novo Mundo						
<i>Lutzomyia</i>	<i>shannoni</i>	não resposta	-	-	-	Mann e Kaufman, 2010
	<i>longipalpis complex</i> (Lutz & Neivai, 1912)	ovos, glândulas acessórias	frass, ração de coelho, fezes de aves e coelhos, comportamento tigmotrópico	Ácido dodecanóico	Hexanal; 2-metil-2-butanol	Elnaiem e Ward, 1992 a,b; Dougherty et al., 1994, 1997; Wasserberg and Rowton, 2011
	<i>renei</i> (Martins, Falcão & Silva, 1957)	levemente atrativo	-	-	mistura: ácido hexadecenóico; ac. octadecenóico; ac. dodecanóico; ac. tetradecanóico.	Alves et al., 2003
<i>Migonemyia</i>	<i>migonei</i> (França, 1920)	-	comportamento tigmotrópico	Nenhum		Nieves et al., 1997
Espécies do Velho Mundo						
<i>Phlebotomus</i>	<i>argentipes</i> (Annandale & Brunetti, 1908)	-	frass (ração, restos de ovos e exuvias)	-		Kumar et al, 2013
	<i>papatasi</i> (Scopoli, 1786)	levemente atrativo	frass	-		Wasserberg and Rowton, 2011; Peterkova-koci et al., 2012; Marayati et al., 2015

1.3. DETECÇÃO DE VOLÁTEIS

Para a extração ou captura de voláteis em insetos, diferentes metodologias são utilizadas. A mais comum é a extração por solventes. Nesse processo, a estrutura responsável pela produção do feromônio, ou o inseto inteiro, são submergidos em pequenos volumes de solventes por um curto período de tempo; após esse período os extratos são concentrados e analisados por análise cromatográfica. Entre os principais solventes utilizados estão diclorometano, hexano e éter dietílico. Este método de extração, acoplado à cromatografia gasosa/espectrometria de massas, foi utilizado para a extração e identificação de todos os feromônios de flebotomíneos conhecidos até o momento (Hummel and Miller 1984).

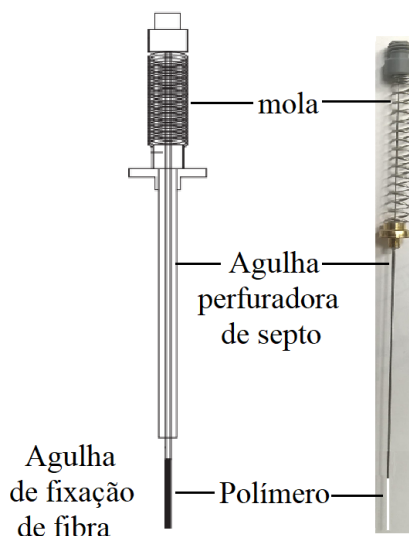
Outra metodologia importante para a detecção de voláteis é a aeração que permite a coleta de voláteis em insetos vivos. Um fluxo de ar passa por uma câmara de contenção, onde os insetos estão confinados e arrasta os voláteis que são retidos em polímeros adsorventes. O adsorvente mais comumente utilizado é o Porapak-Q, polímero de etilvinilbenzeno-divinilbenzeno. Após o processo de coleta, os voláteis capturados são dessorvidos por extração em solventes como o hexano, concentrados e analisados por cromatografia. Esta metodologia é importante quando se deseja concentrar voláteis por um período prolongado de tempo e em situações em que um grande número de insetos são necessários (Hummel and Miller 1984). Esta metodologia foi utilizada recentemente para a quantificação do feromônio sexual em *Lu. longipalpis* em três diferentes populações (Gonzalez et al. 2017).

Uma alternativa ao uso de solventes, utilizados nas duas metodologias acima descritas, é a microextração em fase sólida.

1.3.1. MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPME, do inglês *Solid phase micro-extraction*)

A microextração em fase sólida (SPME) é uma técnica livre de solventes, que integra amostragem, extração e concentração em uma única etapa (Zhang et al. 1994). O dispositivo de SPME consiste numa haste revestida de polímero que absorve ou adsorve os analitos das amostras (Figura 1). Este polímero determina a natureza polar ou apolar da fibra, e sua escolha depende da natureza química da amostra. As fibras têm como vantagens a simplicidade no manuseio, sensibilidade, seletividade, rapidez, ausência de solventes orgânicos no processo de dessorção, assim como a possibilidade de serem utilizadas no laboratório e em campo (Arthur and Pawliszyn 1990, Pawliszyn 2012).

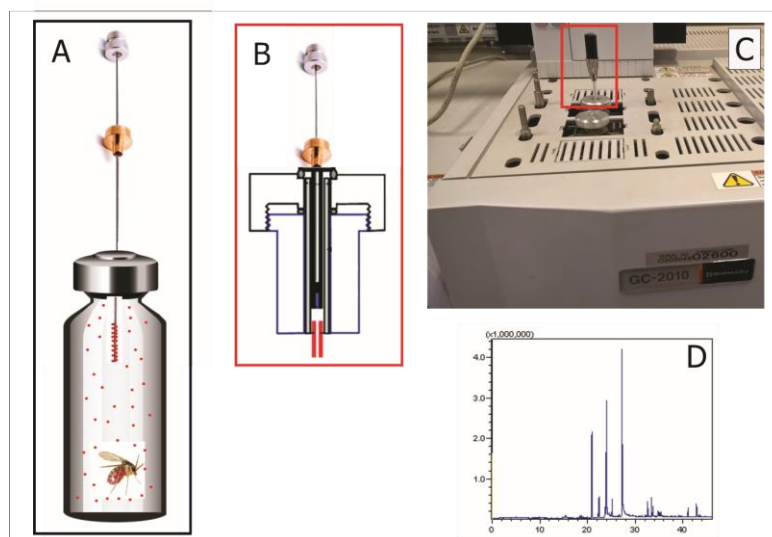
Figura 1. Dispositivo Manual SPME.



Fonte: Pawliszyn, J. (2012).

Há dois tipos de extração por SPME, a extração direta e a extração por *headspace* (HS). Na extração direta a fibra é colocada em contato com a amostra, sendo que este tipo de extração é utilizada em amostras poucos voláteis. Na extração por *headspace* a fibra é exposta em um recipiente fechado contendo a amostra, mas sem entrar em contato direto com a mesma; este tipo de extração é importante para compostos voláteis e semivoláteis. Após os compostos, ou analitos, serem adsorvidos pelo polímero da fibra, o segundo passo consiste na dessorção dos mesmos diretamente em um cromatógrafo gasoso com detector de massas acoplado (CG/MS) (Figura 2).

Figura 2. Procedimento de coleta dos voláteis *in vivo* por *headspace*-SPME **A.** Extração dos analitos, **B.** Dessorção dos analitos: Fibra SPME inserida no injetor do cromatógrafo a gás para a dessorção dos compostos, **C.** Injetor do cromatógrafo a gás: local de inserção da fibra. Imagem ilustrativa, **D.** Cromatograma. Adaptado do Handbook of Solid Phase Microextraction. Pawliszyn, J. (2012).



Fonte: Próprio autor.

As fibras SPME estão disponíveis comercialmente e são identificadas de acordo com os polímeros que as revestem: Divinilbenzeno/Carboxen/polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS), Poliacrilato (PA), Polidimetilsiloxano/divinilbenzeno (PDMS/DVB), Polidimetilsiloxano (PDMS), Carbowax-divinilbenzeno (CW/DVB) e Carboxen/polidimetilsiloxano (CAR/PDMS). Estes polímeros determinam a polaridade e sorção das fibras (Pawliszyn 2012, Supelco 2017) (Tabela 3).

Tabela 3. Fibras SPME, segundo tipo de revestimento, polaridade e sorção.

Tipos de Polímeros	Método de extração	Polaridade
7 µm PDMS	Absorção	Apolar
30 µm PDMS	Absorção	Apolar
100 µm PDMS	Absorção	Apolar
85 µm PA	Absorção	Polar
60 µm PEG (Carbowax)	Absorção	Polar
15 µm Carbowax - PDMS	Adsorção	Bipolar
65 µm PDMS-DVB	Adsorção	Bipolar
55 µm/30µm DVB/Carboxen-PDMS	Adsorção	Bipolar
85 µm Carboxen-PDMS	Adsorção	Bipolar

Fonte: Pawliszyn, J. (2012)

O SPME é amplamente difundido, sendo utilizado para amostras de contaminantes como pesticidas, herbicidas, amins, em amostras ambientais como água, solo, ar e sedimentos, na indústria farmacêutica, nas análises de alimentos e fragrâncias e na amostragem in vivo dos compostos voláteis produzidos por bactérias, insetos, plantas, animais e humanos (Shuqin and Gangfeng 2017).

Para insetos hematófagos o SPME-CG/MS, já foi utilizado na identificação de compostos voláteis emanados por plantas, aves e seres humanos que atuam como atrativos para culicídeos, *Culex pipiens pipiens* (Mauer and Rowley 1999), *Culex pipiens pallens* (Yu et al. 2018) e *Culex quinquefasciatus* (Syed and Leal 2009, Granados-Echegoyen et al. 2014); como repelentes para *Aedes aegypti* (Jaenson et al. 2006, Gu et al. 2009) ou compostos que favorecem a oviposição em *Anopheles gambiae* ss. (Lindh et al. 2008).

Além dos culicídeos, diversas espécies de triatomíneos foram examinadas por essa técnica, como por exemplo, para a investigação dos compostos voláteis emanados de fezes de *Triatoma infestans*, *Panstrongylus megistus* e *T. brasiliensis* (Mota et al. 2014); voláteis liberados por fêmeas ou machos de *Rhodnius prolixus* (Pontes et al. 2008), *T. dimidiata* (May-Concha et al. 2012), *T. longipennis*, *T. pallidipennis* e *T. phyllosoma* (May-Concha et al. 2018); compostos cuticulares em *Triatoma infestans* (Cocchiararo-Bastias et al. 2011) ou na avaliação da resposta comportamental de *Rhodnius prolixus* a voláteis liberados por bactérias da pele humana (Tabares et al. 2018). Em carrapatos, há pesquisas envolvendo o SPME na identificação de compostos voláteis de óleos essenciais e extratos de plantas que atuam como repelentes (Jaenson et al. 2005, Palsson et al. 2008, Garboui et al. 2009), assim como na caracterização dos voláteis liberados por fêmeas ingurgitadas (Zahradnickova and Bouman 2006). Para flebotomíneos, não há registros na literatura da utilização do SPME para a extração e posterior identificação por CGMS de compostos voláteis.

2. OBJETIVOS

- Investigar o SPME como método alternativo à extração com solventes, para a detecção de feromônios sexual e oviposição em flebotomíneos.
- Investigar a presença de compostos voláteis envolvidos nos comportamentos de oviposição e cópula em flebotomíneos.

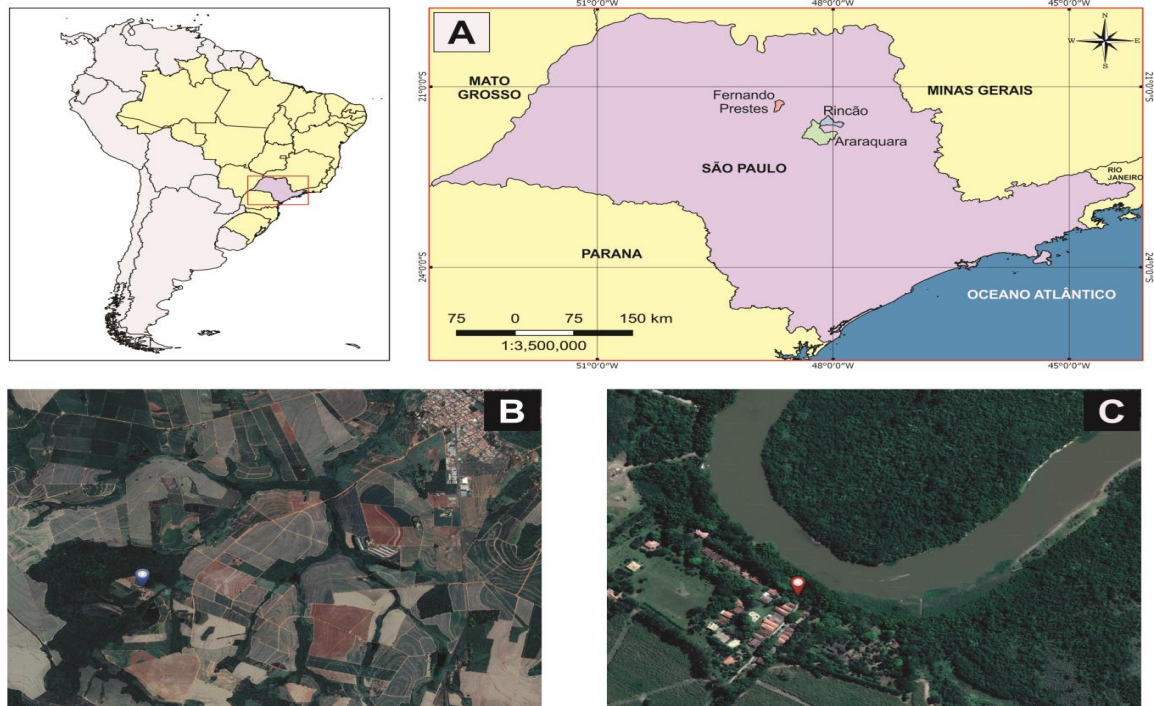
3. MATERIAL E MÉTODOS COLETA EM CAMPO: ÁREAS DE COLETA DE FLEBOTOMÍNEOS

Considerando as espécies de flebotomíneos alvo deste estudo, foram realizadas coletas em dois municípios do estado de São Paulo; **Fernando Prestes**: para a coleta de *Pintomyia fischeri*, *Nyssomyia whitmani* e *Migonemyia migonei*; e **Rincão**: para captura de *Nyssomyia neivai* (Figura 3).

O município de Fernando Prestes está localizado à noroeste do estado de São Paulo, com uma população estimada de 5.778 habitantes, a 545 metros acima do nível do mar e ocupa uma área de 170.112 km² (IBGE 2018). Entre o período 2007 – 2017, o município notificou apenas dois casos confirmados de leishmaniose tegumentar americana (LTA) no ano 2014 (SVS, 2018). Não há registros de casos confirmados de leishmaniose visceral (SUCEN, 2018). As armadilhas foram alocadas no interior e na borda de uma extensa área de mata residual (área aproximada 1,81 km²) e no peridomicílio de uma residência (-21.29294; -48.722118) próxima a esta. As coletas foram realizadas com auxílio de armadilhas luminosas de tipo HP (Pugedo et al. 2005) instaladas a 1,5 metros de altura, penduradas em árvores ou próximas a galinheiros e chiqueiros, das 18:00 às 6:00 h. Os insetos foram separados com ajuda de aspirador de Castro e acondicionados em recipientes contendo uma camada de gesso úmido na base e algodão embebido em açúcar 30% (Figura 4). Foram transportados em caixas de isopor com gel pack e algodão embebido em água para manter a temperatura (20-22° C) e umidade (80-90%) até a chegada ao Laboratório de Parasitologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP para início da criação.

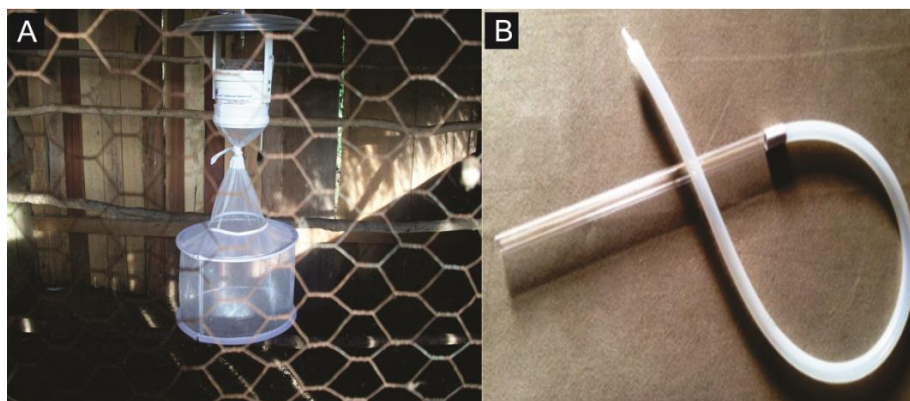
O município de Rincão está localizado a noroeste do estado de São Paulo, com uma população estimada em 2018 em 10.786 habitantes, a 530 metros acima do nível do mar e ocupa uma área de 316.639 km²(IBGE 2018). Entre o período 2007 – 2017, não há registros de casos de leishmanioses no município (SVS, 2018; SUCEN, 2018). Os insetos foram coletados entre as 18:00 e 21:00 horas, com ajuda de aspirador de castro na parede externa de uma residência localizada à beira do Rio Mogi-Guaçu (-21.612209; -47.879902), distante 46 km do Campus Unesp, Araraquara. Os insetos foram transportados em gaiolas confeccionadas em voil (30x30x30cm). Para conservar a umidade a gaiola foi coberta por um saco plástico, contendo algodão úmido no seu interior. Os insetos foram alimentados com uma solução de sacarose 30%.

Figura 3. A. Localização dos municípios de coleta de flebotomíneos no estado de São Paulo. B. Ponto 1 (-21.29294; -48.722118), no município de Fernando Prestes, SP.; local de coleta de *Nyssomyia whitmani*, *Pintomyia fischeri* e *Migonemyia migonei*., C. Ponto 2 (-21.612209; -47.879902) no município de Rincão, SP., local de coleta de *Nyssomyia neivai*.



Fonte: Próprio autor.

Figura 4. A. Armadilha luminosa tipo HP, instalada próxima a galinheiros e chiqueiros, B. Aspirador de Castro, para sucção dos insetos.



Fonte: Próprio autor.

Como relatado acima, basicamente todos os estudos de feromônios em flebotomíneos foram realizados com *Lu. longipalpis*. Por essa razão, essa espécie foi utilizada no presente estudo para fins de padronização e comparações. A colônia de *Lu. longipalpis* (Panorama/ SP; 9-metil-germacreno-B) foi estabelecida com insetos provenientes do Laboratório de Entomologia em Saúde Pública - Phlebotominae da Faculdade de Saúde Pública da USP, gentilmente cedidos pela Profa. Dra. Eunice A. B. Galati e Dr. Fredy Galvis Ovallos.

3.2. MANUTENÇÃO DE FLEBOTOMÍNEOS EM LABORATORIO

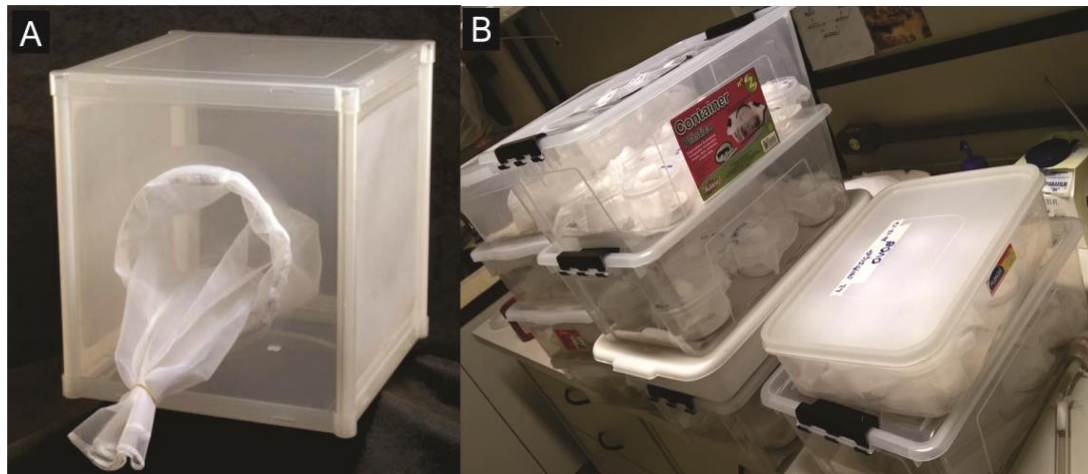
3.2.1. Manutenção de *Nyssomyia neivai*

Os insetos coletados foram mantidos em gaiola de Barraud (Figura 5), com uma solução de sacarose 30%; temperatura $26\pm 1^{\circ}\text{C}$; 60-80% de umidade relativa e fotoperíodo 12:12 horas (claro:escuro). Como fonte alimentar sanguínea foi oferecido um camundongo anestesiado (xilazina 2%; 0,05 mL/200 mg)/quetamina 10%; 0,20 mL/200mg), em conformidade com o protocolo aprovado pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista (UNESP), CEUA/FCFCAr: 21/2018. As fêmeas ingurgitadas foram mantidas na gaiola por 24 horas, para o acasalamento com os machos. Após este período as fêmeas foram individualizadas em recipientes com fundo de gesso úmido para oviposição. As fases imaturas dos insetos foram criadas seguindo o protocolo estabelecido no nosso laboratório para *Nyssomyia neivai* (Goulart et al. 2015, Goulart et al. 2017).

3.2.2. Padronização das condições de criação para *Ny. whitmani*, *Mg. migonei* e *Pi. fischeri*

Para os insetos capturados em Fernando Prestes, onde já se sabia que predominariam as espécies *Ny. whitmani*, *Mg. migonei* e *Pi. fischeri*, foram oferecidas três diferentes fontes sanguíneas, camundongo, hamster e cordona. Os roedores anestesiados e a codorna foram inseridos um após o outro por espaço de uma hora cada. As fêmeas alimentadas foram separadas em gaiolas diferentes, segundo a fonte sanguínea e colocadas com igual ou maior número de machos. Foram deixadas por 48 horas antes de serem individualizadas ou em grupo (mistura de espécies) de até 10 fêmeas nos potes de oviposição. Inicialmente, todas as espécies coletadas foram mantidas de acordo com o protocolo de criação de flebotomíneos estabelecido no nosso laboratório por Goulart (2015), trabalhando com a espécie *Ny. neivai*. Entretanto, as particularidades de cada espécie demandaram adaptações que serão detalhadas nos Resultados – item 4.3, Padronização.

Figura 5. A. Gaiola Barraud para o transporte e criação dos flebotomíneos em laboratório.
B. Recipientes plásticos para o armazenamento e criação das fases imaturas dos insetos.



Fonte: Próprio autor.

3.3. PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE HEADSPACE - MICRO EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA SEGUIDA DE CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROFOTOMETRIA DE MASSA (HS-SPME-CG/MS)

Para os ensaios de comportamento, de oviposição e de coorte foram utilizados machos e fêmeas virgens. Para evitar o acasalamento, insetos recém-emergidos foram separados por sexo, data e hora de emergência, mantidos em recipientes de criação com base de gesso úmido e alimentados com uma solução de sacarose 30%, com temperatura controlada e fotoperíodo 12:12 horas (claro:escuro). A data e hora de emergência dos insetos adultos foram registradas em cada recipiente.

3.3.1. SELEÇÃO DAS FIBRAS, TEMPERATURA DE PRÉ-EQUILÍBRIO E TEMPO DE EXTRAÇÃO.

A temperatura e o tempo são variáveis que desempenham um papel crucial no processo de extração e determinação dos compostos voláteis por HS-SPME-CG/MS. Essa influência está em função da natureza química do analito de interesse, do tamanho da amostra e do volume do headspace (Kolb and Ettre 2006).

Fibras e Temperatura: Para fins didáticos, o processo inicial envolvido na metodologia do HS-SPME-CG/MS será dividido em três fases:

Fase 1. Pré-equilíbrio, que envolve o tempo e a temperatura em que a amostra em headspace (HS) será submetida antes da inserção da fibra no recipiente, que chamaremos de temperatura de pré-equilíbrio.

Fase 2. Extração dos voláteis, quando há a inserção da fibra SPME no recipiente. Nessa etapa, o tempo e a temperatura, que chamaremos de temperatura de extração ou sorção, também são avaliados.

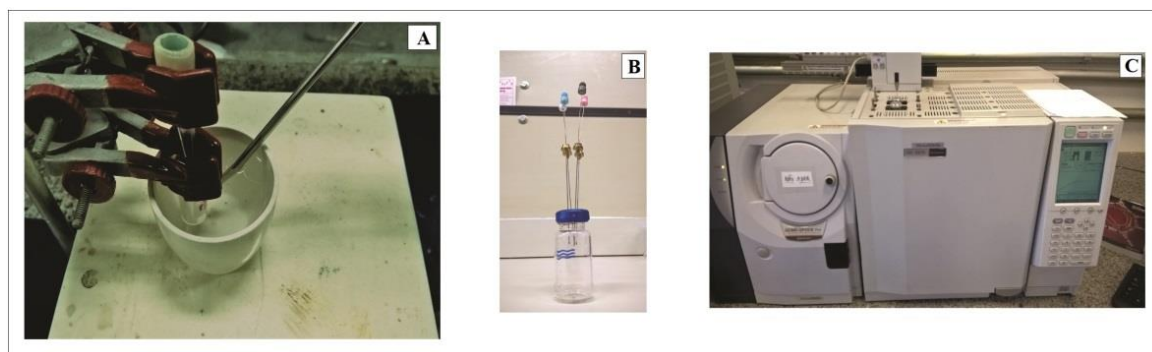
Fase 3. Dessorção dos voláteis, quando há a inserção da fibra na porta de injeção no cromatógrafo gasoso acoplado à espectrofotometria de massa (CG/MS). (Figura 6)

Para a extração do feromônio sexual, durante a fase de pré-equilíbrio, machos virgens de *Lu. longipalpis* de 4-5 dias de idade foram colocados individualmente em um frasco de vidro com 10 mL de capacidade. O frasco foi vedado e submetido a aquecimento em banho de silicone por 45 min, nas seguintes temperaturas: 50, 70, 110, 130, 150, 170° C.

Após este período, na fase 2 do processo, o recipiente foi retirado do aquecimento e quatro fibras, com diferentes revestimentos, foram inseridas dentro de cada recipiente e expostas para a sorção dos voláteis durante 45 min. Em seguida, as fibras foram retraídas para o interior das agulhas, retiradas e armazenadas no freezer até o processo de dessorção dos compostos no injetor do cromatógrafo por 5 min/250° C. A melhor fibra foi selecionada levando-se em consideração o número de compostos (picos totais) e as suas respectivas áreas de pico (quantidade) resultantes das extrações no cromatógrafo. As fibras de SPME avaliadas foram: **1.** Poliacrilato (PA), revestimento de 85 µm; **2.** Polidimetilsiloxano-divinilbenzeno (PDMS-DVB), 65 µm; **3.** Carboxen-Polidimetilsiloxano (CAR-PDMS), 85 µm; **4.** Divinilbenzeno-Carboxen-Polidimetilsiloxano (DVB-CAR-PDMS), 50/30 µm (Supelco, Bellefonte, PA, USA).

Destes ensaios, selecionou-se a fibra DVB-CAR-PDMS na temperatura de pré-equilíbrio de 170° C.

Figura 6. Ilustração do processo de coleta dos voláteis sob aquecimento por HS-SPME-CG/MS. A. Pré-equilíbrio a diferentes temperaturas: 50, 70, 110, 130, 150 e 170° C; B. Extração dos analitos: Fibras SPME inseridas dentro de cada recipiente e expostas para a sorção dos voláteis a temperatura ambiente por 45 min; C. Dessorção térmica dos compostos na porta de injeção, cromatógrafo gasoso.



No procedimento acima descrito, os insetos foram mortos pelo calor e, na tentativa de avaliar a liberação dos compostos voláteis em temperatura ambiente, mais ensaios foram realizados variando o número de insetos vivos e o volume do recipiente. Machos, fêmeas virgens ou casais, de *Lu. longipalpis* com sete dias após emergência foram utilizados nesses testes. O número de insetos utilizados foi muito variável (1 a 25 insetos), pela dependência do número de insetos disponíveis na colônia. Os volumes dos recipientes avaliados foram: 20, 10, 5 e 1,5 mL.

3.3.2. ANÁLISE POR GC/MS

As análises cromatográficas foram realizadas com um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas, modelo Shimadzu QP 2010 (PLUS), equipado com uma coluna Rtx-5MS, de 30 m de comprimento com 0,25 mm diâmetro interno e 0,25 μ m de espessura de filme. A temperatura do injetor foi 250° C no modo splitless; o forno foi programado inicialmente a uma temperatura de 50° C por 2 min; e incrementado na razão de 5° C min⁻¹, até 190° C. O gás hélio foi utilizado como gás de arraste na vazão de 1 mL min⁻¹. No detector de massas, as temperaturas da fonte de íons e da interface foram 250° C e varredura de espectros de 40 a 600 m/z. As condições cromatográficas utilizadas foram adaptadas dos trabalhos de identificação de feromônio de oviposição e sexual para *Lu. longipalpis* (Hamilton et al. 1996c, Dougherty and Hamilton 1997). Um resumo do processo de padronização da

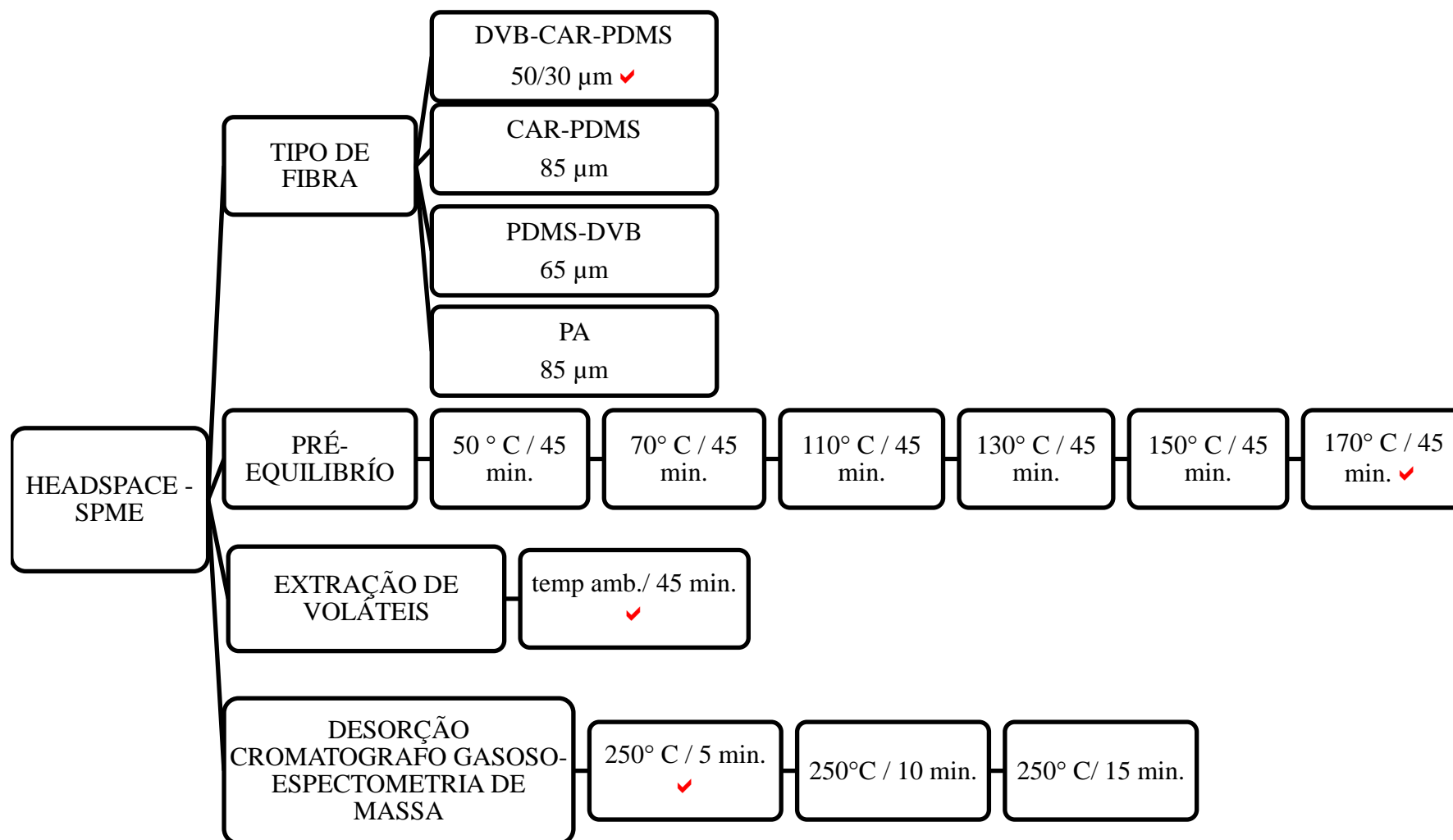
extração de voláteis em machos de *Lu. longipalpis* para a determinação de feromônio sexual é apresentado na figura 7.

3.3.3. BIBLIOTECAS DE REFERÊNCIA E PADRÕES COMERCIAIS

A identificação dos compostos foi realizada pela comparação dos espectros de massas obtidos nas corridas cromatográficas, com os das bibliotecas NIST8 (National Institute of Standard and technology), e Wiley v229, sendo considerados aqueles compostos com similaridade $\geq 90\%$; pela comparação do índice de retenção (IR) obtido com o da literatura disponíveis nos sites: Pubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) e Nist (<https://webbook.nist.gov/chemistry/name-ser/>) e também pela co-injeção de padrões analíticos: ácido dodecanóico, dodecanal e nonanal. Foram calculados também os índices de retenção (IR). O padrão do feromônio sexual de *Lu. longipalpis*, 9-metil-germacreno-B, não está disponível comercialmente.

Figura 7. Resumo esquemático das condições avaliadas no desenvolvimento do método de extração/dessorção por HS-SPME-CG/MS

✓ = condição ótima para a extração.

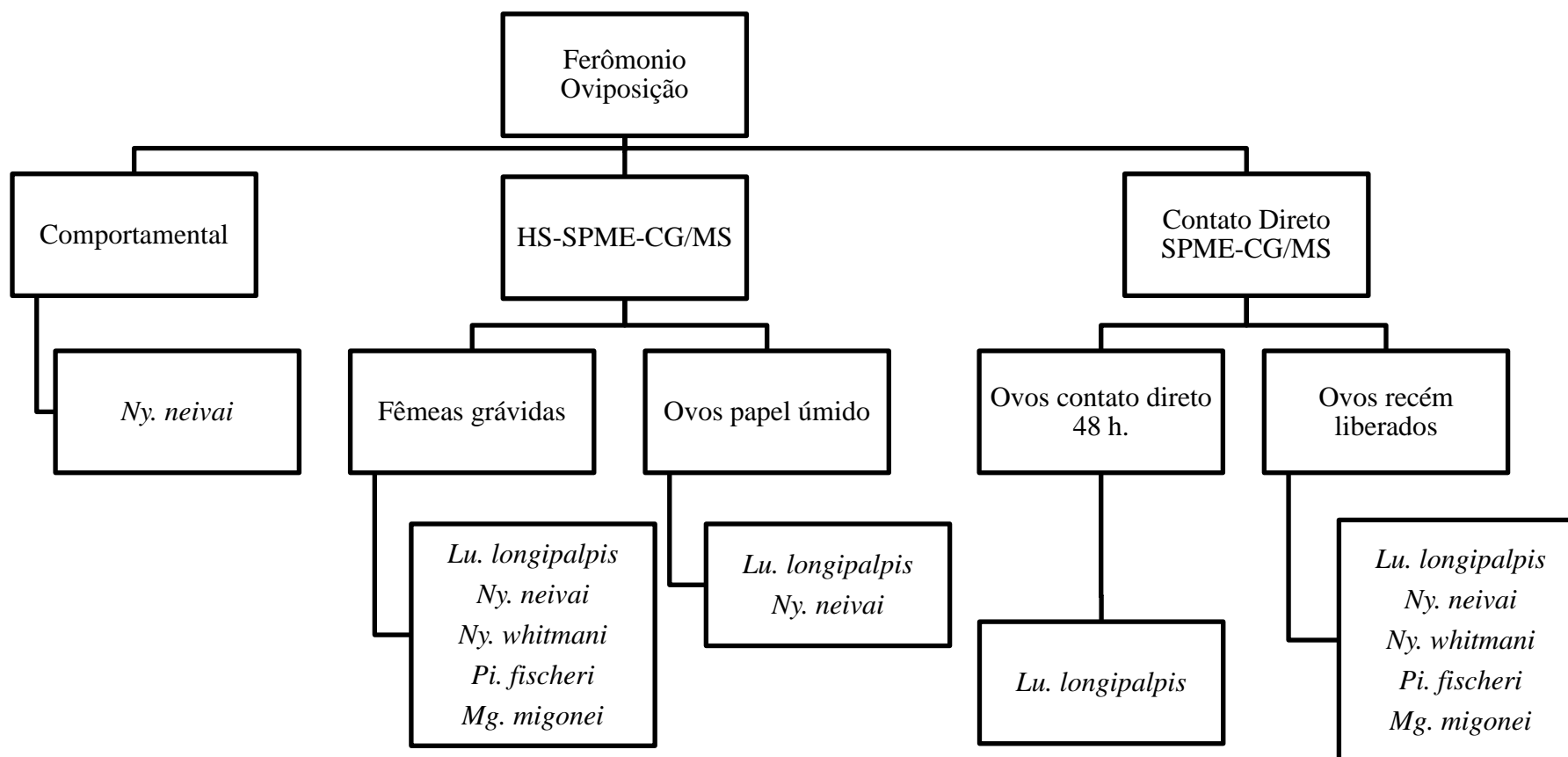


Fonte: Próprio autor.

3.4. AVALIAÇÃO DE FEROMÔNIOS DE OVIPOSIÇÃO

Os ensaios envolvidos na avaliação dos feromônios de oviposição para as diferentes espécies de flebotomíneos são sumarizados na Figura 8.

Figura 8. Fluxograma dos ensaios utilizados na avaliação dos compostos voláteis liberados em fêmeas grávidas e ovos de diferentes espécies de flebotomíneos.



3.5. ENSAIO COMPORTAMENTAL PARA DETERMINAÇÃO DE FEROMÔNIOS DE OVIPOSIÇÃO EM *Nyssomyia neivai*

3.5.1. ALIMENTAÇÃO DE FÊMEAS E ACASALAMENTO

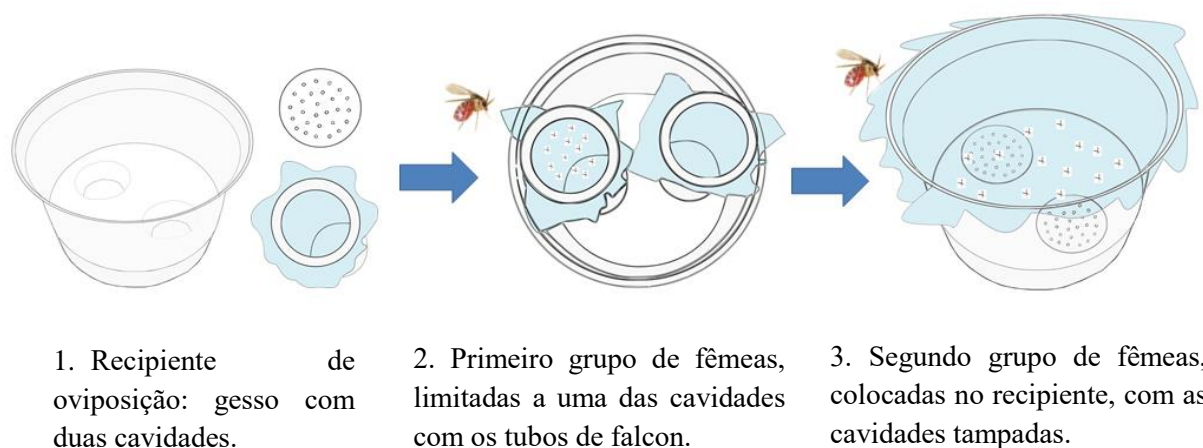
Um total de 200 casais de *Ny. neivai* foram colocados em uma gaiola de Barraud (30x30x30cm). Um camundongo anestesiado foi inserido dentro da gaiola como fonte sanguínea para as fêmeas por 40-60 minutos. Com a finalidade de garantir o acasalamento, machos e fêmeas ingurgitadas foram mantidas por mais 72 horas na gaiola; uma solução de 30% de sacarose foi oferecida e renovada a cada 24 horas. Após este período o ensaio comportamental foi realizado.

3.5.2. ATRATIVIDADE DE FÊMEAS GRÁVIDAS DE *Ny. neivai* PARA OVOS COESPECÍFICOS

Para a investigação da presença de feromônios de oviposição foram utilizados recipientes plásticos de polipropileno de 120 mm de diâmetro, contendo gesso na base para oviposição. Com o intuito de evitar qualquer possível estímulo tátil ou visual das fêmeas para a oviposição, os ovos foram escondidos em uma das cavidades circulares de 55 mm de diâmetro e 20 mm de profundidade no gesso, com ajuda de uma tampa perfurada e confeccionada em gesso. As cavidades estavam localizadas nos lados extremos do recipiente (Figura 9).

Um primeiro grupo de seis casais de *Ny. neivai* (com fêmeas já ingurgitadas há 72 horas) foram confinados em uma das cavidades dos recipientes de oviposição por meio de tubos de centrifugação tipo Falcon. Após dois dias, os casais foram retirados e o número de ovos foi registrado. Somente foram considerados para o teste, recipientes com um número maior de 100 ovos (Elnaiem and Ward 1991). Após a contagem dos ovos, as duas cavidades foram fechadas com tampas de gesso perfuradas para a saída dos possíveis voláteis. Um novo grupo de sete casais, com fêmeas ingurgitadas há 72 horas, foi colocado no recipiente para oviposição. Após dois dias os insetos foram retirados do pote e o número de ovos sobre as tampas perfuradas e nas áreas laterais foi registrado. Os experimentos foram realizados em dois períodos diferentes, setembro e dezembro de 2017, com indivíduos de campo. Em setembro foram realizadas dez réplicas e em dezembro outras 16 réplicas. A análise estatística foi realizada pelo teste *t* de Student pareado.

Figura 9. Etapas do ensaio comportamental para investigação de feromônio de oviposição em *Nyssomyia neivai*.



Fonte: Próprio autor.

3.5.3. AVALIAÇÃO DA ATRATIVIDADE DO ÁCIDO DODECANÓICO EM FÊMEAS GRÁVIDAS DE *Ny. neivai*.

Ácido dodecanóico nos potes com cavidades

Na tentativa de verificar se o ácido dodecanóico (feromônio de oviposição identificado para *Lu. longipalpis*) atrairia ou estimularia a oviposição de fêmeas grávidas de *Ny. neivai*, um bioensaio foi realizado, nos mesmos moldes descritos no item anterior, comparando cavidade contendo solução de ácido dodecanóico frente à cavidade controle com hexano. Os cálculos utilizados para as diluições do ácido dodecanóico foram baseados nos dados da literatura com *Lu. longipalpis*, em que, 100 ovos têm aproximadamente 40 ng de ácido dodecanóico (Dougherty and Hamilton 1997). A solução estoque de ácido dodecanóico foi preparada, pesando 0,010 g do padrão comercial (Sigma-Aldrich) em 100 mL de hexano grau pesticida, com concentração final 100 ng/ μ L. O papel filtro, embebido com 1,2 μ L (120 ng ou 300 ovos) da solução de ácido dodecanóico foi colocado na cavidade teste; do outro lado um papel embebido com hexano foi utilizado na cavidade controle. As duas cavidades foram fechadas com tampas de gesso perfuradas para a saída dos possíveis voláteis. Para estes ensaios fêmeas provenientes de campo foram utilizadas.

Um grupo de seis casais de *Ny. neivai*, com fêmeas já ingurgitadas há 72 horas, foram colocados no recipiente para oviposição. Após 48 horas os insetos foram retirados e o número de ovos sobre as tampas perfuradas e nas áreas laterais foi registrado (Figura 9). Foram realizadas vinte réplicas. A análise estatística foi realizada pelo teste *t* de Student pareado

Ácido dodecanóico exposto diretamente

Dados da literatura com testes de atratividade do ácido dodecanóico para *Lu. longipalpis* foram realizados de forma que os insetos tivessem contato diretamente com o papel filtro embebido na solução padrão. Para efeito de verificar se há diferença na resposta nessas condições, mais três ensaios foram realizados permitindo às fêmeas o contato com diferentes volumes da solução estoque do ácido dodecanóico. Os volumes avaliados foram 1,2 μL , equivalente a 300 ovos em *Lu. longipalpis*; 1,5 μL (150ng – 375 ovos) e 2,4 μL (240 ng – 600 ovos). Foram realizadas 15 réplicas para cada volume. A análise estatística foi realizada pelo teste *t* de Student pareado.

3.5.4. EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS POR MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA EM HEADSPACE DURANTE A OVIPOSIÇÃO E POSTERIOR DETERMINAÇÃO CROMATOGRÁFICA (HS-SPME-CG/MS)

Para a coleta dos possíveis voláteis liberados durante a oviposição de *Lu. longipalpis* e *Ny. neivai*, em temperatura ambiente, seis fêmeas com 72 horas após repasto sanguíneo foram colocadas em recipientes de vidro borosilicato transparente de 10 e 1,5 mL, contendo papel de filtro úmido e um pequeno pedaço de algodão embebido em uma solução de sacarose 30%. Os vials foram selados com septo de silicone e lacre de alumínio, e colocados em posição horizontal. Após 12 horas do início do teste, uma fibra de SPME (DVB-CAR-PDMS) foi inserida através do septo e trocada depois de 12 horas por uma segunda fibra que permaneceu mais 24 horas para a sorção dos compostos voláteis até completar 48 horas desde que as fêmeas foram inseridas. Após este período, as fibras foram retraídas para o interior das agulhas e armazenadas em um recipiente fechado a -60°C até as análises cromatográficas. Foram realizadas sete réplicas e um controle (papel de filtro úmido com algodão com sacarose) (Figura 10).

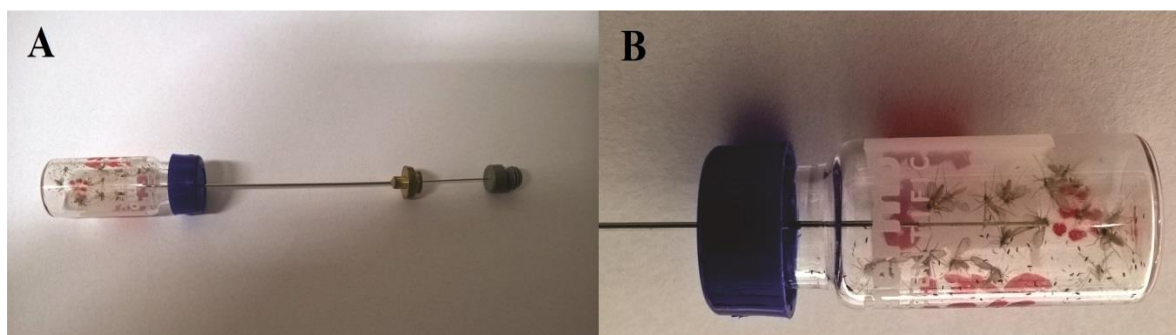
Aquecimento e extração de voláteis por headspace em *Lu. longipalpis* e *Ny. neivai*

Após o término do experimento, as fêmeas que ainda estavam vivas, assim como seus ovos, foram avaliadas separadamente por *headspace* em uma segunda etapa, sendo transferidas para novos recipientes (1,5 mL) em número de 5-10 fêmeas. Fêmeas e ovos foram então submetidos a 170°C por 45 minutos. Após este processo os recipientes foram retirados da fonte de calor e colocados à temperatura ambiente; imediatamente a fibra foi inserida e exposta por mais 45 minutos (Figura 6). Finalizado esse tempo, as fibras foram retraídas, retiradas dos recipientes e inseridas no cromatógrafo gasoso.

Aquecimento e extração de voláteis por *headspace* em *Nyssomyia whitmani*, *Pintomyia fischeri* e *Migonemyia migonei*

Devido ao reduzido número de insetos das espécies *Ny. whitmani*, *Pi. fischeri* e *Mg. migonei*, as fêmeas foram avaliadas por aquecimento a 170° C x 45 min, após oviposição, segundo a metodologia descrita no item anterior.

Figura 10. A. Coleta de voláteis in vivo por headspace durante a oviposição de fêmeas de *Ny. neivai*, B. Detalhe do headspace, com as fêmeas e ovos recém ovipostos nas paredes do recipiente.



Fonte: Próprio autor.

3.5.5. EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS POR CONTATO – SPME E POSTERIOR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTOFOTOMETRIA DE MASSA.

Para o uso da metodologia descrita no item 3.5.4, houve algumas dificuldades logísticas devido ao número elevado de insetos e ovos que são necessários para esses ensaios, acarretando perda de indivíduos necessários para o desenvolvimento das colônias. Com o intuito de contornar esse problema, testou-se a coleta de compostos diretamente da superfície de ovos. Em *Lu. longipalpis* foi determinado que é possível a identificação do ácido dodecanóico em ovos com até 48 horas após a oviposição (Dougherty and Hamilton 1997). Desse modo, os compostos de superfície foram avaliados por contato da fibra DVB-CAR-PDMS diretamente sobre a superfície dos ovos em duas situações:

a) Ovos com até 48 horas após a oviposição

Os ovos coletados no papel úmido foram retirados e colocados sobre lâmina de vidro; a lâmina foi previamente lavada com hexano para retirar qualquer possível contaminante. Imediatamente a fibra foi colocada em contato com os ovos por um período de 5 minutos. Este procedimento foi realizado para *Lu. longipalpis* e *Ny. neivai* (Figura 11).

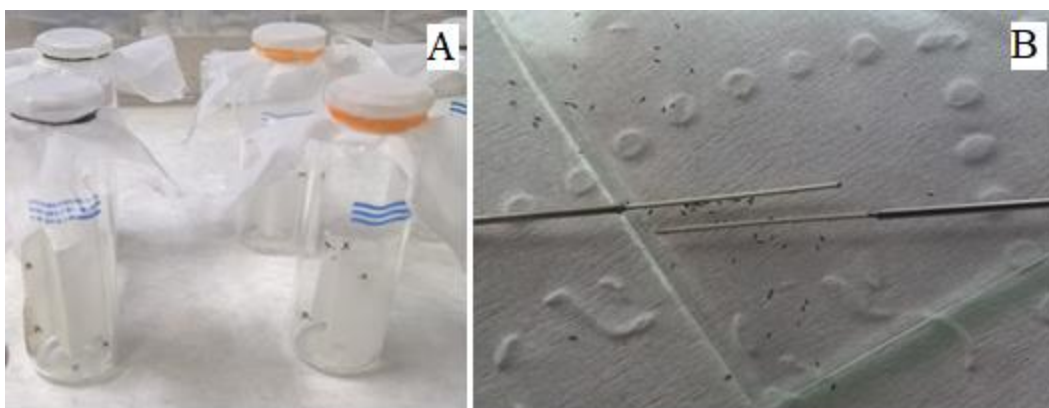
b) Ovos recém-liberados após estímulo (solução salina)

Ensaio de rotina do nosso laboratório, trabalhando com fêmeas em fase de oviposição, evidenciaram que, quando as fêmeas são colocadas sobre uma lâmina com uma gota de solução salina, apresentam um impulso repetitivo (ou espasmo) que ocasiona a expulsão dos ovos. Dessa forma, fêmeas grávidas foram colocadas nessa condição até que o primeiro ovo fosse liberado. Nesse momento, a fibra foi colocada na parte final do abdômen da fêmea. Este procedimento foi realizado por um período de 5 minutos ou até que o impulso de liberação cessasse, para as cinco espécies de flebotomíneos estudadas (Figura 12).

c) Para o controle, foram analisadas fêmeas virgens ingurgitadas

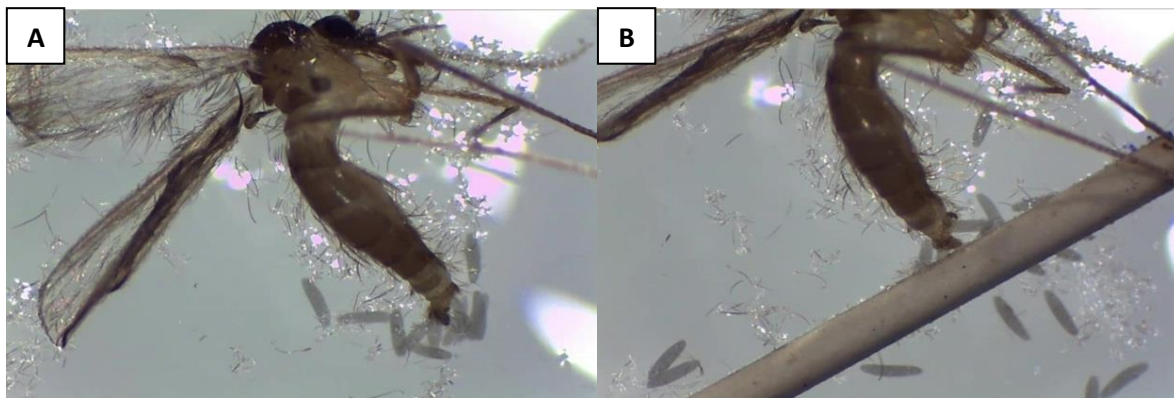
O mesmo comportamento foi observado em fêmeas virgens após cinco dias de ingurgitadas, mas sem a liberação de ovos; compostos não foram detectados nestas fibras. Após o procedimento, as fibras foram retraídas para o interior das agulhas e armazenadas em um recipiente fechado a -60° C até as análises cromatográficas.

Figura 11. Coleta de compostos da superfície de ovos de *Lu. longipalpis*. **A.** Vials (10 mL) com papel filtro umedecido e fêmeas grávidas para oviposição x 48 horas; **B.** Coleta de voláteis por contato direto com ovos.



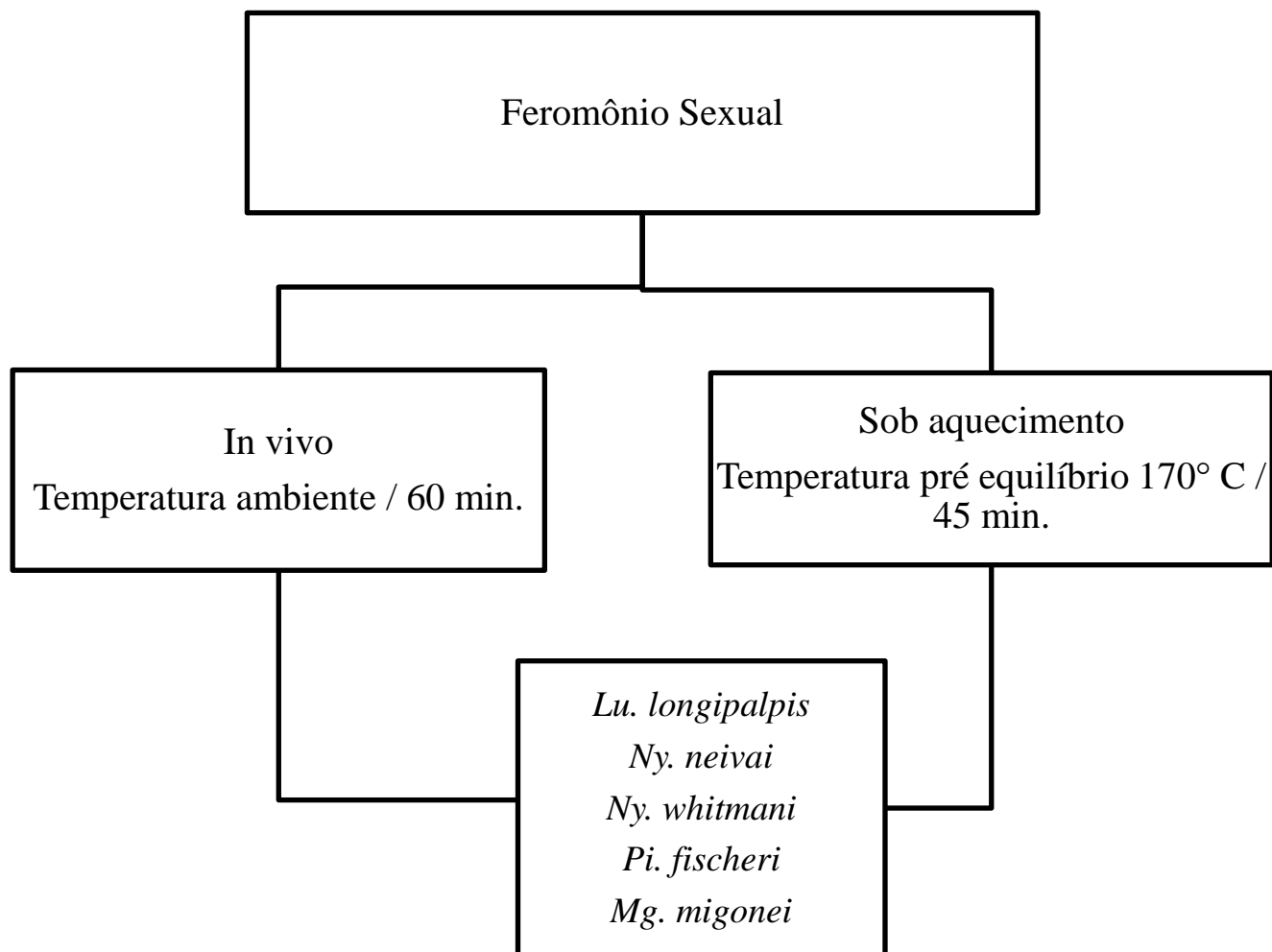
Fonte: Próprio autor.

Figura 12. Processo de coleta dos compostos liberados durante a oviposição de fêmeas de flebotomíneos; **A.** Fêmea liberando ovos em solução salina; **B.** Fibra SPME em contato com ovos liberados, próximo à parte distal do abdômen. Fonte: Próprio autor.



Fonte: Próprio autor.

Figura 13. Fluxograma dos ensaios para avaliação dos compostos voláteis liberados por machos de flebotomíneos.

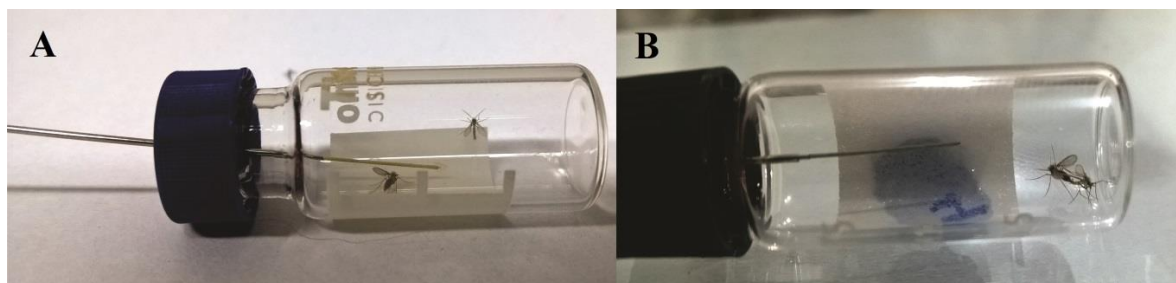


Fonte: Próprio autor.

3.6. EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS POR MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA EM HEADSPACE DURANTE O COMPORTAMENTO DE COORTE E ACASALAMENTO E POSTERIOR DETERMINAÇÃO CROMATOGRÁFICA (HS-SPME-CG/MS)

3.6.1. In Vivo (temperatura ambiente): De 01 a 25 machos e fêmeas virgens ou de 01 a 3 casais, com sete dias após emergência foram colocados em um recipiente de 1,5 mL selados com septo de silicone e lacre de alumínio. Para a captura dos voláteis foi utilizada uma fibra SPME (DVB-CAR-PDMS), a qual foi inserida através do septo no headspace do frasco e exposta durante 1 hora à temperatura ambiente ($26 \pm 2^\circ \text{C}$). Após este período, as fibras foram retraídas para o interior das agulhas e armazenadas em um recipiente fechado, a -60°C até as análises cromatográficas. Um recipiente vazio foi avaliado como controle. Esse procedimento foi realizado para as cinco espécies: *Lu. longipalpis*, *Ny. neivai*, *Ny. whitmani*, *Pi. fischeri* e *Mg. migonei* (Figura 14). Para cada uma das réplicas um novo recipiente foi utilizado, isto para evitar possíveis contaminações.

Figura 14. Coleta de voláteis por HS-SPME in vivo, com a mesma fibra. **A.** Antes da cópula **B.** Durante a cópula. Procedimento realizado para as cinco espécies. (Foto: *Ny. neivai*).



Fonte: Próprio autor.

3.6.2. Amostras submetidas à ação de calor: De 01 a 25 machos e 01 a 12 fêmeas com 5-7 dias após emergência foram colocados em um recipiente de 1,5 mL selados com septo de silicone e lacre de alumínio. Foram submetidas a aquecimento por meio de um banho de silicone a 170°C por 45 min.; após este período as amostras foram retiradas do banho de silicone e uma fibra SPME (DVB-CAR-PDMS) foi inserida e exposta para a sorção dos voláteis durante 45 min. Após este período, as fibras foram retraídas para o interior das agulhas e armazenadas em um recipiente fechado, a -60°C até as análises cromatográficas. Esse procedimento foi realizado para as cinco espécies de flebotomíneos.

4. RESULTADOS

4.1. COLETA EM CAMPO

Em relação à coleta em campo, embora não seja objetivo do trabalho quantificar o número de flebotomíneos coletados, os dados abaixo indicam a relação proporcional entre as espécies capturadas em uma coleta na área de Fernando Prestes. Esse número de indivíduos e proporção entre as espécies manteve-se em outras coletas. De um total de 456 flebotomíneos: 130 (28,5%) eram fêmeas e 326 (71,5%) machos. As fêmeas foram identificadas após oviposição como pertencentes a cinco espécies: *Nyssomyia whitmani* 114 (87,7%), *Pintomyia fischeri* 6 (4,6%), *Migonemyia migonei* 5 (3,8%), *Evandromyia sallesi* 2 (1,5%) e *Brumptomyia avellari* 3 (2,3%).

Na área de Rincão, *Ny. neivai* é prevalente, correspondendo a 99% das espécies.

4.2. MANUTENÇÃO DE FLEBOTOMÍNEOS EM LABORATÓRIO

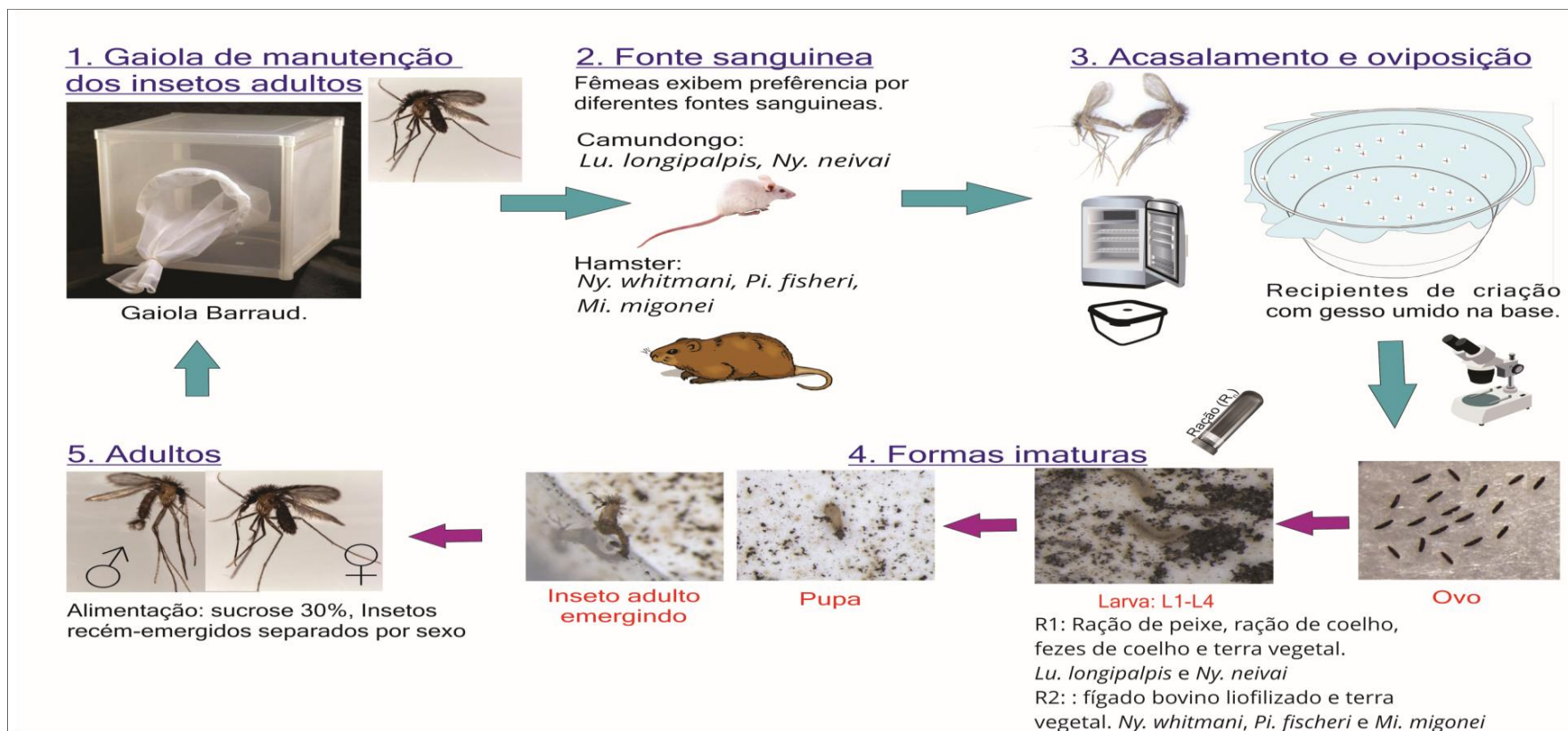
A metodologia descrita por Goulart (Goulart et al. 2015, Goulart et al. 2017) para a criação de *Ny. neivai* foi utilizada como ponto de partida para o estabelecimento das quatro novas espécies. Entretanto, no decorrer do processo de criação foram necessárias algumas adequações (Figura 15).

4.3. PADRONIZAÇÃO DE CRIAÇÃO

4.3.1. ESTABELECIMENTO DE COLÔNIA DE *Lutzomyia longipalpis*

A mistura de ração de coelho, ração de peixe, fezes de coelho e terra vegetal (em iguais proporções) utilizada na criação das larvas de *Ny. neivai* foi oferecida com ótimos resultados, embora em maiores quantidades (3 vezes mais) para as fases larvais de *Lu. longipalpis*. Em relação à umidade relativa, esta espécie apresentou melhor desenvolvimento quando foi reduzida de 80% para 60%. Goulart e colaboradores verificaram que a vermiculita constituía um ótimo substrato para as larvas de *Ny. neivai* (Goulart et al. 2015, Goulart et al. 2017), ajudando na quebra das hifas dos fungos que cresciam nos recipientes de criação por conta do excesso de alimento e umidade; no caso de *Lu. longipalpis*, não foi necessária a utilização deste substrato nos recipientes de criação. A voracidade das larvas foi responsável por manter os recipientes livres de fungos, dos quais elas se alimentam. Outro fator importante foi que as larvas evitavam o contato com a vermiculita, subindo nas paredes dos potes. Até a presente data, dez gerações (F10) de *Lu. longipalpis* foram alcançadas no laboratório.

Figura 15. Processo de criação dos flebotomíneos em laboratório.



Fonte: Próprio autor.

4.3.2. ESTABELECIMENTO DE COLÔNIAS DE *Ny. whitmani*, *Pi. fisheri* *Mg. migonei*

Em relação às seguintes espécies *Ny. whitmani*, *Pi. fisheri* e *Mg. migonei*, a metodologia de criação descrita para *Ny. neivai* não foi eficaz. As dificuldades mais comuns foram aparecimento de fungos, morte de larvas por inanição, assim como o número elevado de ovos inférteis. Diante disso, optamos pela metodologia descrita por Ribeiro e colaboradores com ligeiras modificações (Ribeiro et al. 2015).

Para estas três espécies, as larvas foram criadas diretamente no gesso úmido, sem adição de algum outro tipo de substrato, com 90% de umidade relativa e temperatura de $25 \pm 1^\circ \text{C}$. A incubadora B.O.D. mostrou-se importante devido à capacidade de manter sob controle a temperatura e umidade dos recipientes de criação (Figura 16). A ração para as fases imaturas, feita da mistura de fígado liofilizado e terra vegetal em iguais proporções foi eficiente para o desenvolvimento dos estádios imaturos das espécies anteriormente citadas.

Embora os estádios imaturos das espécies *Pi. fisheri* e *Mg. migonei* tenham atingido a fase adulta (F1), os adultos apresentaram algumas dificuldades tais como: a necessidade das fêmeas de realizar 2 a 3 repastos sanguíneos para conseguir ovipor; mesmo assim, muitos dos ovos foram inférteis.

O resumo de todos os fatores físicos (tipo de substrato), fatores ambientais (umidade e temperatura) e nutricionais (fonte sanguínea e composição da ração) são apresentados na Tabela 4.

Figura 16. B.O.D. para criação de insetos. Fotoperíodo 12:12 horas (claro/escuro), temperatura $25 \pm 1^\circ \text{C}$, umidade relativa: $80 \pm 5\%$.



Fonte: Próprio autor.

Tabela 4. Condições de criação das espécies de flebotomíneos. R1: Ração de peixe, ração de coelho, fezes de coelho e terra vegetal (1:1:1:1) (Goulart et al. 2017); R2: fígado bovino liofilizado, terra vegetal (1:1) (Ribeiro et al. 2015); S1: Sala de criação, temperatura: $28\pm 2^\circ\text{C}$ / B.O.D.: Incubadora B.O.D., temperatura 25 ± 1 . Ciclo gonotrófico estimado apenas para F1.

Espécies	Temp° C	UR%	Ambiente de criação	Geração (lab.)	Dieta larvas (ração)	Ciclo gonotrófico (dias)	Fonte sanguínea	Ciclo de vida (dias)
<i>Ny. neivai</i>	26 ± 2	60-80	S1	F5	R1	3-5	camundongo	30
<i>Lu. longipalpis</i>	26 ± 2	50-60	S1	F9	R1	6-10	camundongo	30
<i>Ny. whitmani</i>	25 ± 1	> 80	B.O.D.	F4	R2	5-7	hamster/codorna	45
<i>Pi. fischeri</i>	25 ± 1	> 80	B.O.D.	F1	R2	7-10	hamster/codorna	45
<i>Mg. migonei</i>	25 ± 1	> 80	B.O.D.	F1	R2	7-10	hamster/codorna	30

Fonte: Próprio autor.

4.4. PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE HEADSPACE - MICRO EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA SEGUIDA DE CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROFOTOMETRIA DE MASSA (HS-SPME-CG/MS)

4.4.1. SELEÇÃO DE FIBRAS, TEMPERATURA DE PRÉ-EQUILÍBRIO E TEMPO DE EXTRAÇÃO

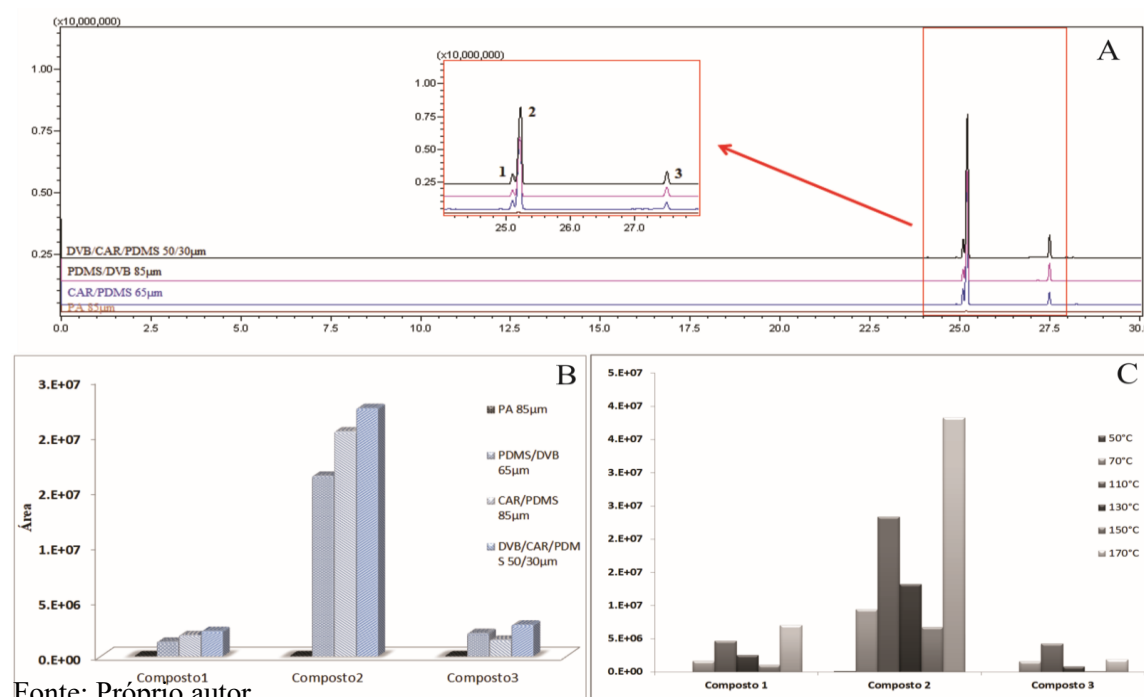
Além do tipo de fibra de SPME empregada nos ensaios, a temperatura e o tempo são variáveis que desempenham um papel crucial no processo de extração e determinação dos compostos voláteis por HS-SPME-CG/MS. Essa influência está em função da natureza química do analito de interesse, do tamanho da amostra e do volume do headspace (Kolb and Ettre 2006). Sendo assim, durante o desenvolvimento do método analítico para análise de feromônios, a melhor fibra de SPME foi selecionada, levando-se em consideração o número de compostos (picos totais) e as suas respectivas áreas de pico (quantidade) resultantes das extrações no headspace.

Um resumo esquemático das condições analíticas estudadas no desenvolvimento do método de extração/dessorção por HS-SPME-GC/MS visando a extração de voláteis em machos de *Lu. longipalpis* para a determinação de feromônio sexual foi apresentado na Figura 7. Para a seleção de fibras, foram utilizados machos de 4 a 5 dias de *Lu. longipalpis*.

Fibras e temperatura. Os melhores resultados foram obtidos com a fibra DVB/CAR/PDMS na temperatura de 170° C durante 45 min, a qual permitiu extrair as maiores áreas para cada um dos três picos detectados (Figura 17). Os cromatogramas resultantes das avaliações para cada uma das temperaturas pré-equilíbrio são apresentados no Apêndice 2.1.

Os três picos são isômeros do Germacreno-B, com uma similaridade de 89-90%. Sabe-se pela literatura que o Germacreno-B (MM=204) é um precursor do 9-metilgermacreno-B, feromônio sexual de *Lu. longipalpis* com massa molecular de 218 (Hamilton et al. 1996c). Os espectros de massa dos compostos encontrados apresentam uma massa molecular de 218, o que significa um radical metil adicional no Germacreno-B. Tais espectros de massa do 9-metilgermacreno-B são apresentados comparativamente com os espectros de massa dos três picos identificados no presente estudo no Apêndice 2.2.

Figura 17. A. Cromatogramas obtidos por HS-SPME-GC-MS nas análises dos compostos voláteis de machos de *Lu. longipalpis* com as fibras SPME: DVB/CAR/PDMS 50/30 μ m; PDMS/DVB 85 μ m; CAR/PDMS 65 μ m e PA 85 μ m. **B.** Comparação das áreas totais dos picos 1, 2, e 3 obtidas por HS-SPME-CG/MS para os quatro diferentes revestimentos das fibras SPME. **C.** Áreas totais obtidas por HS-SPME/CGMS dos picos 1, 2, e 3 com a fibra DVB/CAR/PDMS, quando submetidas às amostras a diferentes temperaturas de pré-equilíbrio.



Fonte: Próprio autor.

Amostras e volumes dos recipientes

No procedimento acima descrito, os insetos foram mortos pelo calor e, na tentativa de avaliar a liberação dos compostos voláteis em temperatura ambiente, mais ensaios foram realizados variando o número de insetos vivos e o volume do recipiente. Machos, fêmeas virgens ou casais, de *Lu. longipalpis* com sete dias após emergência foram utilizados nesses testes. O número de insetos utilizados foi muito variável (1 a 25 insetos), pela dependência do número de insetos disponíveis na colônia. Os volumes dos recipientes avaliados foram: 20, 10, 5 e 1,5 mL.

A partir de diferentes volumes e número de insetos foi possível a detecção do feromônio sexual de *Lu. longipalpis* com apenas um casal em um recipiente de 1,5 mL. Entretanto, observou-se que há diferença individual na quantidade do feromônio liberado, visto que em nem todos os casais avaliados na mesma condição foi possível detectá-lo (Tabela 5).

Tabela 5. Número de insetos e volumes de recipientes amostrados, para a detecção in vivo de voláteis em machos e casais de *Lutzomyia longipalpis* (9-metil-germacreno-B). Pico 1,2 e 3 são isômeros do 9-metil-germacreno-B.

Recipiente volume	Nº insetos	Temperatura/ tempo	Idade (dias)	Pico 1	Pico 2	Pico 3
20 mL	25♂	26° C/60 min	5-6	443270	2483421	665016
20 mL	22♂/12♀	26° C/60 min	5-6	153786	1288664	95100
10 mL	3♂/3♀	26° C/60 min	5-6	-	222673	-
10 mL	3♂/3♀	26° C/60 min	7	-	351026	-
10 mL	2♂/1♀	26° C/60 min	7	-	172621	-
10 mL	1♂/1♀	26° C/60 min	7	-	-	-
10 mL	1♂/1♀	26° C/60 min	7	-	-	-
10 mL	1♂/1♀	26° C/60 min	7	-	-	-
10 mL	1♂/1♀	26° C/60 min	7	-	-	-
10 mL	1♂/1♀	26° C/70 min	7	-	-	-
10 mL	1♂/1♀	26° C/70 min	7	-	-	-
10 mL	1♂	26° C/60 min	5-6	-	-	-
10 mL	1♂	26° C/60 min	5-6	-	-	-
10 mL	1♂	26° C/60 min	7	-	-	-
10 mL	1♂	26° C/60 min	7	-	-	-
5 mL	1♂/1♀	26° C/60 min	5-6	-	-	-
5 mL	1♂/1♀	26° C/60 min	5-6	-	-	-
5 mL	1♂/1♀	26° C/60 min	5-6	-	-	-
5 mL	1♂/1♀	26° C/60 min	5-6	-	-	-
1.5 mL	1♂/1♀	26° C/90 min	5-6	187882	1417057	252767
1.5 mL	1♂/1♀	26° C/90 min	5-6	-	50344	-
1.5 mL	1♂/1♀	26° C/90 min	5-6	-	-	-
1.5 mL	1♂/1♀	26° C/90 min	5-6	-	-	-
1.5 mL	1♂/1♀	26° C/90 min	5-6	38843	360957	-
1.5 mL	1♂/1♀	26° C/90 min	5-6	168888	1439374	-

4.5. BIOENSAIO PARA DETERMINAÇÃO DE FEROMÔNIO DE OVIPOSIÇÃO

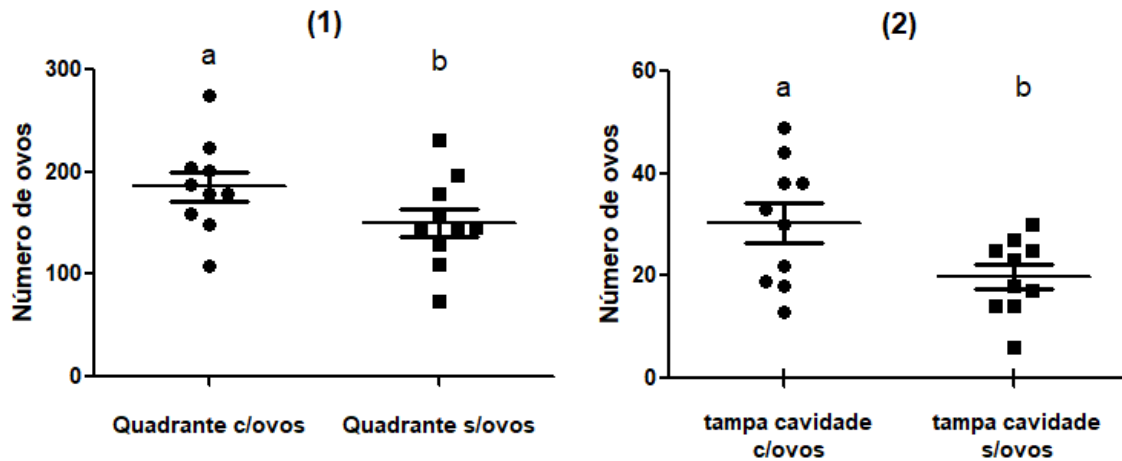
4.5.1. ATRATIVIDADE DE FÊMEAS DE *Ny. neivai* A OVOS COESPECÍFICOS

Devido ao baixo número de insetos coletados em campo, e aos problemas citados com a criação das demais espécies de flebotomíneos, os experimentos comportamentais foram realizados apenas com *Ny. neivai*.

Nas primeiras 10 réplicas realizadas em setembro de 2017, o número de ovos colocados previamente (ou seja, antes do segundo grupo de fêmeas) variou de 123 a 539 ovos, com uma média de 295 ovos. O resultado da oviposição do segundo grupo de fêmeas evidenciou uma preferência pelo local contendo ovos previamente ovipostos ($n=304$; $\bar{x}=30$) do que pela cavidade controle ($n=199$; $\bar{x}=20$) ($t=4.079$, $p=0,0028$). Também se evidenciou que no quadrante referente às cavidades que continham os ovos, o número dos ovos foi maior ($n=1861$; $\bar{x}=186$) que no quadrante dos controles ($n=1505$; $\bar{x}=151$) ($t=2.368$, $p=0.0420$) (Figura 18). Estes dados sugerem que os compostos voláteis dos ovos teriam alguma atratividade sobre as fêmeas grávidas de *Ny. neivai*.

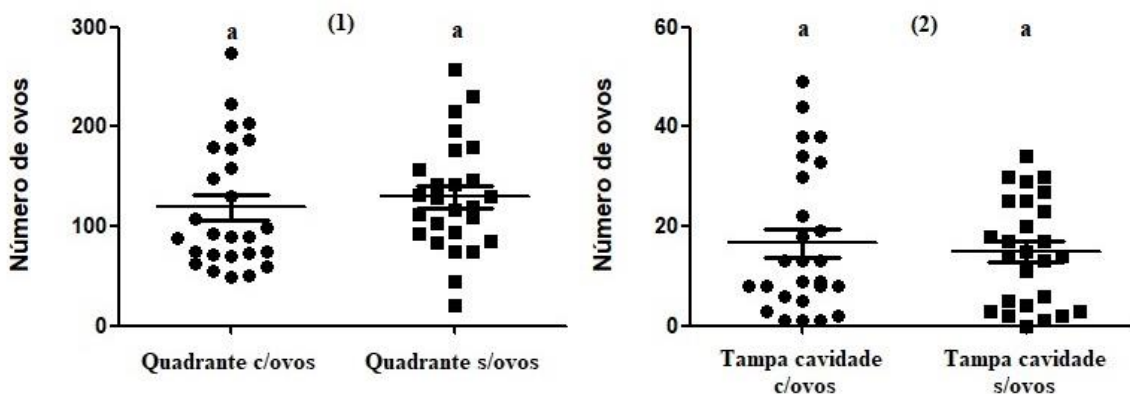
Nas outras 16 réplicas que foram realizadas, em dezembro de 2017, o número de ovos variou de 80 a 271 ovos, com uma média de 190. Diferentemente do resultado anterior, o número de ovos colocados pelo segundo grupo de fêmeas sobre o local que já continha ovos foi menor ($n=129$; $\bar{x}=8$) que no controle ($n=189$; $\bar{x}=12$), porém sem diferença estatística significativa ($t=1.008$, $p=0.3295$). Com relação aos quadrantes, houve um menor número de ovos na área com ovos prévios, $n=1228$; $\bar{x}=77$, que no controle $n=1856$; $\bar{x}=116$; nesse caso sendo detectada diferença estatística ($t=3.053$, $p=0.0081$). Quando foi realizada a análise conjunta das 26 amostras, não foi detectada diferença estatística do número de ovos, tanto na região da tampa ($t=0,6137$; $p=0,5449$), quanto nos quadrantes ($t=0,8677$; $p=0,3938$) (Figura 19).

Figura 18. Atratividade de ovos coespecíficos em fêmeas grávidas de *Ny. neivai*, realizada em setembro (n=10) (1) Posturas realizadas sobre os quadrantes teste e controle; (2) Posturas realizadas sobre as cavidades tampadas dos quadrantes teste e controle. Letras desiguais indicam diferença estatística entre os tratamentos ($p < 0,05$).



Fonte: Próprio autor.

Figura 19. Atratividade de ovos coespecíficos para fêmeas grávidas de *Ny. neivai* – coletas de setembro e dezembro (n=26) (1) Posturas realizadas sobre os quadrantes teste e controle; (2) Postura realizadas sobre as cavidades tampadas dos quadrantes testes e controle. Letras iguais indicam que não houve diferença estatística entre os tratamentos ($p > 0,05$).



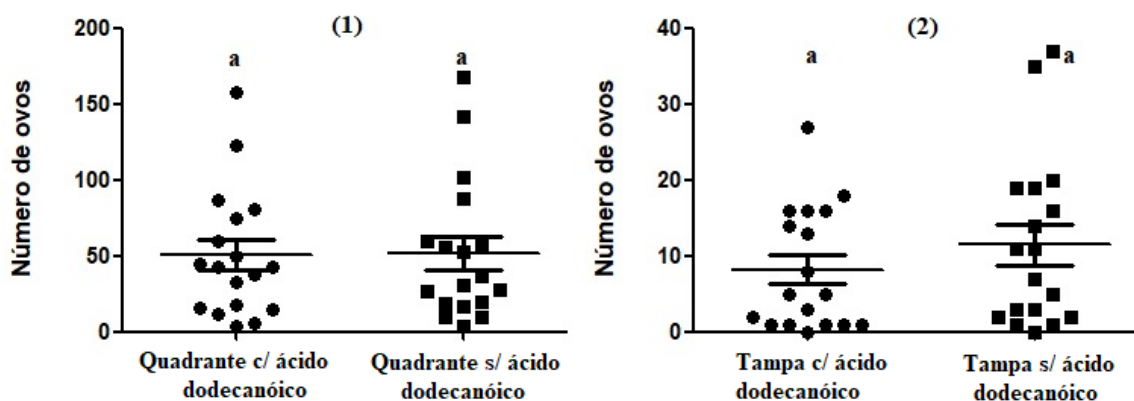
Fonte: Próprio autor.

4.5.2. AVALIAÇÃO DA ATRATIVIDADE DO ÁCIDO DODECANÓICO EM FÊMEAS GRÁVIDAS DE *Ny. neivai*.

Ácido dodecanóico em potes com cavidades

Das 20 réplicas realizadas em março de 2018, em apenas 18 houve quantidade suficiente de ovos que permitissem fazer comparações. O resultado da oviposição das fêmeas não evidenciou uma preferência pelo local contendo a solução padrão do ácido dodecanóico ($n=148$; $\bar{x}=8$), em relação à cavidade controle ($n=206$; $\bar{x}=11$), inclusive com maior número de ovos no controle ($t=2.051$, $p=0,0560$). O mesmo comportamento foi evidenciado nos quadrantes. No quadrante referente às cavidades que continham a solução de ácido dodecanóico, o número dos ovos foi menor ($n=907$; $\bar{x}=50$) que no quadrante dos controles ($n=930$; $\bar{x}=52$), porém sem diferença significativa ($t=0.2226$, $p=0.8265$) (Figura 20).

Figura 20. Atratividade do ácido dodecanóico (120 ng) para fêmeas grávidas de *Ny. neivai*, (1) Posturas realizadas sobre os quadrantes teste e controle; (2) Postura realizadas sobre as cavidades tampadas dos quadrantes testes e controle. Letras iguais indicam que não houve diferença estatística entre os tratamentos ($p>0,05$).



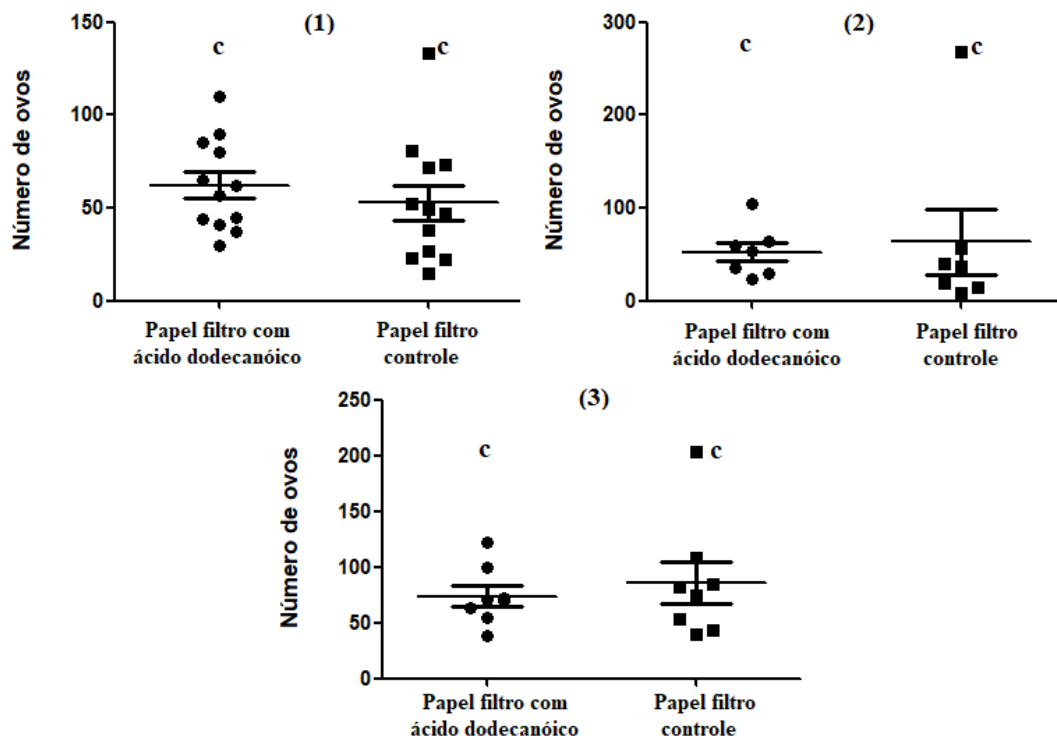
Fonte: Próprio autor.

Ácido dodecanóico exposto diretamente

Nos ensaios de atratividade para o ácido dodecanóico colocado diretamente sobre o papel filtro os resultados mostraram que, das 15 réplicas realizadas para cada volume, apenas 12, 7 e 8 réplicas para os volumes de 1,2 μL , 1,5 e 2,4 respectivamente puderam ser avaliadas, isto devido à alta mortalidade das fêmeas durante a oviposição. O resultado da oviposição das fêmeas quando colocado um volume de 1,2 μL não evidenciou preferência pelo local contendo o ácido dodecanóico ($n=746$; $\bar{x}=62$) do que pela cavidade controle ($n=632$; $\bar{x}=53$) ($t=0,9420$, $p=0,3664$); resultados similares foram observados no volume de 1,5 μL , em que o local com o ácido dodecanóico ($n=369$;

$\bar{x}=53$) não apresentou diferença significativa frente ao hexano controle ($n=444$; $\bar{x}=63$) ($t=0,3945$, $p=0,7068$). Nos recipientes que continham quadrantes com 240 ng de ácido dodecanóico (2,4 μL) ($n=590$; $\bar{x}=74$) não foi observada estatística diferença frente ao controle ($n=688$; $\bar{x}=86$) ($t=0,8049$, $p=0,4473$) (Figura 21).

Figura 21. Atratividade do ácido dodecanóico para fêmeas grávidas de *Ny. neivai*; avaliando a oviposição em quadrantes testes com diferentes volumes do composto (1). 1,2 μL (equivalente a 120 ng de ácido dodecanóico); (2). 1,5 μL (150ng) e (3). 2,4 μL (240 ng) frente aos quadrantes controles. Letras iguais indicam que não diferem estatisticamente entre si ($p>0,05$).



Fonte: Próprio autor.

Estes dados sugerem que o ácido dodecanóico, nas concentrações avaliadas, não apresentou atratividade para as fêmeas grávidas de *Ny. neivai*.

4.6. MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPME) PARA DETERMINAÇÃO DE FEROMÔNIO DE OVIPOSIÇÃO

4.6.1. EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS POR MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA EM HEADSPACE DURANTE A OVIPOSIÇÃO E POSTERIOR DETERMINAÇÃO CROMATOGRÁFICA (HS-SPME-CG/MS)

Para os ensaios referentes à detecção de feromônio de oviposição, parâmetros como volume do recipiente, número de fêmeas e quantidade de ovos foram avaliados. Na avaliação da oviposição em recipientes com 10 e 1,5 mL, em temperatura ambiente, após 12 horas de início do teste foi possível observar a presença de ovos depositados na superfície úmida do papel, bem como nas paredes do recipiente, sendo observadas algumas diferenças nas espécies avaliadas.

Para *Lu. longipalpis*, houve maior oviposição no recipiente de maior volume (10 mL) e as fêmeas mantiveram-se vivas até o final do teste. Porém, no recipiente de 1,5 mL, a oviposição foi menor em decorrência da alta mortalidade das fêmeas nas 12 primeiras horas.

Em *Ny. neivai*, também foi maior o número de ovos colocados no recipiente maior, porém as fêmeas sobreviveram pelas 12 horas iniciais no recipiente de 1,5 mL, atingindo até 16 horas de sobrevivência. Entretanto, comparativamente, o número de ovos no recipiente de 1,5mL foi maior do que para *Lu. longipalpis* (Tabela 6).

As fibras resultantes da extração dos possíveis voláteis liberados durante o período de oviposição (24 e 48 horas) foram inseridas no cromatógrafo gasoso para a dessorção e análises dos compostos. Nestas condições não foram detectados picos.

Aquecimento e extração de voláteis por headspace SPME

Quando essas fêmeas e ovos foram aquecidos a 170° C por 45 min. e submetidos à extração por SPME, verificou-se que em *Lu. longipalpis*, tanto as fêmeas quanto os ovos, apresentaram picos indicando a presença de ácido dodecanóico, que foi confirmado com o tempo de retenção e o uso de padrão comercial. Este composto já é descrito na literatura como feromônio de oviposição para esta espécie.

Para *Ny. neivai*, nessas mesmas condições, não houve detecção do ácido dodecanóico em fêmeas ou ovos. Por essa razão, a fim de aumentar as chances de detecção de compostos voláteis, optou-se por reunir um grande número de ovos da mesma idade para as análises por HS-SPME-CG/MS. Foi possível reunir um número máximo de 855 ovos, os quais foram submetidos à extração por calor, mas sem resultado positivo para o ácido dodecanóico (Tabela 6).

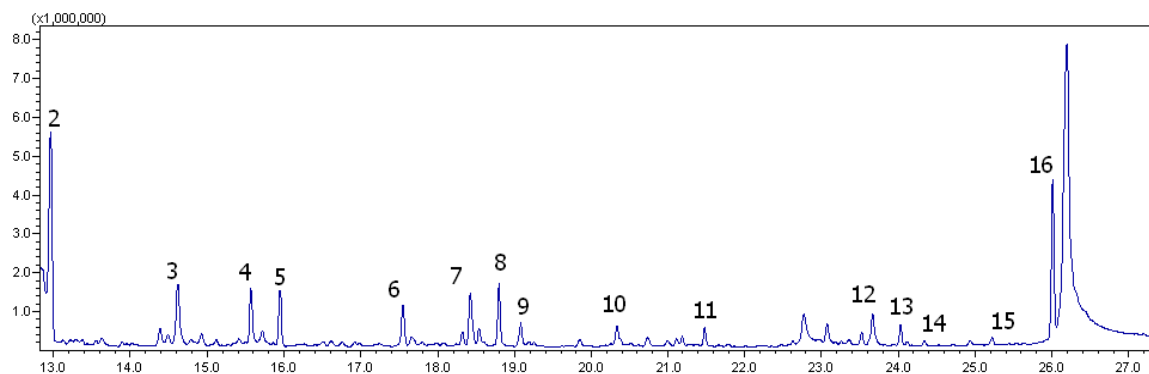
Tabela 6. Número de ovos de *Lutzomyia longipalpis* e *Nyssomyia neivai* depositados em recipientes de 10 e 1,5 mL. Extração e detecção de compostos voláteis por aquecimento através do HS-SPME-GC/MS em ovos de até 48 horas de idade e fêmeas após oviposição.

Vial volume	Espécies flebotomíneos			
	<i>Lutzomyia longipalpis</i>		<i>Nyssomyia neivai</i>	
	fêmeas	ovos	fêmeas	ovos
10 mL	7(+)	171(+)	10(-)	240(-)
	6(+)	229(-)	7(-)	162(-)
		91(-)	6(-)	117(-)
			40(-)	855(-)
1,5 mL		10(-)	9(-)	114(-)
		24(-)		83(-)
		2(-)		

Aquecimento e extração de voláteis por headspace em *Nyssomyia whitmani*, *Pintomyia fischeri* e *Migonemyia migonei*

Pelo aquecimento a 170 ° C a 45 min., as fêmeas de *Ny. whitmani*, *Pi. fischeri* e *Mg. migonei* foi possível detectar o ácido dodecanóico. Os compostos detectados em todas as espécies avaliadas são apresentados a seguir (Tabela 7, Figura 22).

Figura 22. Cromatograma obtido por GC-MS resultante da extração dos compostos voláteis de fêmeas de *Pi. fischeri*, obtidos por HS-SPME-CG/MS. Fibra utilizada DVB/CAR/PDMS (cinza). Os números dos picos correspondem à tabela 7.



Fonte: Próprio autor.

4.6.2. EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS POR MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA POR CONTATO EM OVOS E POSTERIOR DETERMINAÇÃO CROMATOGRÁFICA (CONTATO-SPME-CG/MS)

Ovos com até 48 horas após a oviposição: *Lu. longipalpis* e *Ny. neivai*

Os melhores resultados foram obtidos utilizando-se vials de 10 mL com tampa e voil. Esse volume facilitou o controle da umidade e a suplementação diária de solução açucarada, bem como o papel filtro, em formato sanfonado, colocado dentro de cada recipiente e umedecido a cada 24 horas por meio de uma seringa, aumentou a sobrevivência das fêmeas, e o número de ovos. Por meio deste processo foi possível extrair o ácido dodecanóico apenas para *Lu. longipalpis*.

Ovos recém-liberados após estímulo

Foi observado, para todas as espécies avaliadas o mesmo comportamento de liberação dos ovos quando as fêmeas são submersas em solução salina, sem diferenças entre o número de ovos liberados, com variação de 1-35 ovos. Nessas condições, o ácido dodecanóico somente não foi detectado em *Ny. neivai*.

Vídeo 1. Liberação de ovos após estímulo em fêmeas grávidas de *Ny. neivai* e extração de compostos por contato com a superfície dos ovos com a fibra DVB-CAR-PDMS.

<https://www.dropbox.com/s/o8h2oeafg30dwms/V%C3%ADdeo%201.%20Libera%C3%A7%C3%A3o%20ovos%20ap%C3%B3s%20est%C3%ADmulo%2C%20Ny%20neivai.mp4?dl=0>

O resumo dos compostos detectados nas espécies avaliadas é apresentado na Tabela 7.

Tabela 7. Compostos identificados em fêmeas e ovos de flebotomíneos por headspace-SPME-CG/MS, 170° C x 45 min. e ovos por contato direto-SPME-CG/MS: (a) após 48 horas; (b) recém-expulsos, para *Lu. longipalpis*, *Ny. neivai*, *Pintomyia fischeri*, *Ny whitmani* e *Mg. migonei*; organizados pelo índice de retenção (IR). (+) compostos detectados; (-) compostos não detectados, (*) traços de compostos.

Composto	Biblioteca NIST e Wiley v229	IR literatura	IR calculado	Fêmeas após oviposição					Ovos em papel umido		Ovos por contato direto				
				<i>Lu.</i> <i>longipalpis</i>	<i>Ny.</i> <i>neivai</i>	<i>Ny.</i> <i>whitmani</i>	<i>Pi.</i> <i>fischeri</i>	<i>Mi.</i> <i>migonei</i>	<i>Lu.</i> <i>longipalpis</i>	<i>Ny.</i> <i>neivai</i>	<i>Lu.</i> <i>longipalpis</i>	<i>Ny.</i> <i>neivai</i>	<i>Ny.</i> <i>whitmani</i>	<i>Pi.</i> <i>fischeri</i>	<i>Mi.</i> <i>migonei</i>
1	Octanal	995	997	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
2	Nonanal	1095	1095	+	+	+	+	+	+	+	+ ^{ab}	+ ^a	-	-	-
3	2-Nonenal, (E)-	1150	1150	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
4	2-Decanona	1180	1180	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
5	N-Decanal	1191	1191	-	+	+	+	+	+	+	+ ^{ab}	+ ^a	-	-	-
6	2-Decenal, (2E)-	1246	1246	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
7	2-Undecanona	1275	1275	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
8	Undecanal	1287	1287	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
9	2,4-Decadienal, (2E,4E)-	1296	1296	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
10	2-Undecenal	1342	1342	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
11	n-Dodecanal	1383	1382	+	-	-	+	-	+	*	-	-	-	-	-
12	2-Tridecanona	1467	1464	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
13	Tridecanal	1483	1478	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
14	Dodecanoato de metilo	1507	1507	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
15	Ácido Dodecanóico	1547	1543	+	-	+	+	+	+	*	+ ^{ab}	-	+ ^b	+ ^b	+ ^b
16	Dodecanoato de etilo	1558	1555	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Fonte: Próprio autor.

4.7. EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS POR MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA EM HEADSPACE DURANTE O COMPORTAMENTO DE CORTE E ACASALAMENTO E POSTERIOR DETERMINAÇÃO CROMATOGRAFICA (HS-SPME-CG/MS)

In Vivo (temperatura ambiente). Pela técnica de HEADSPACE-SPME/CGMS foi possível confirmar a presença do feromônio sexual de *Lu. longipalpis* (9-metil-Germacreno-B) em casais, apresentando diferenças nas áreas totais dos picos, indicando uma provável liberação diferenciada entre os indivíduos (Figura 23). Nos machos, quando avaliados individualmente, 9-metil-Germacreno-B não foi detectado. Para as outras espécies avaliadas, alguns compostos foram detectados sem que tenha sido possível comprovar suas funções biológicas.

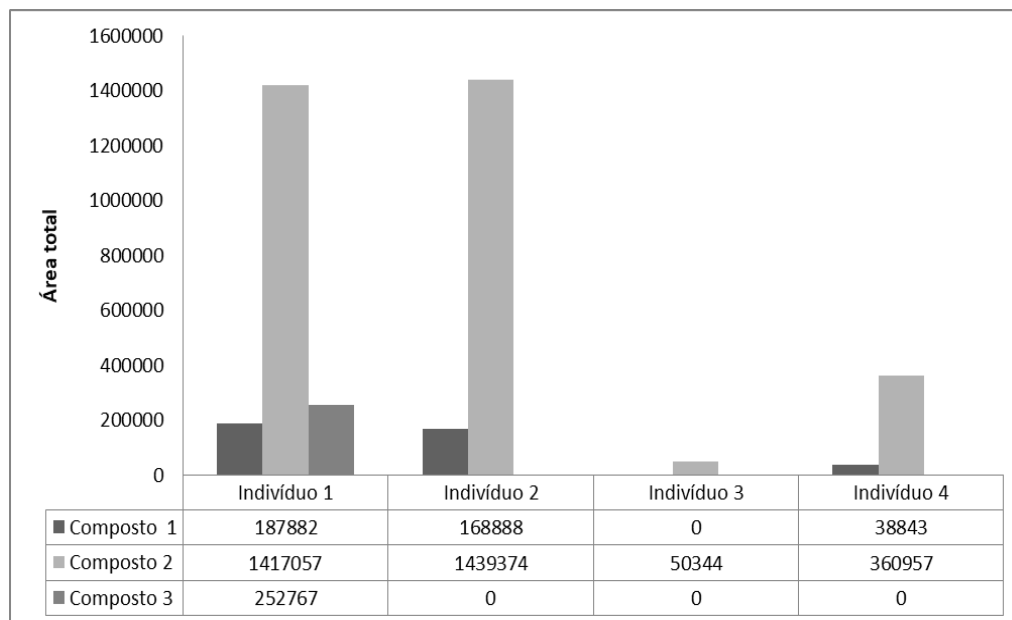
Vídeo 2. Comportamento de corte de um casal de cinco dias de idade da espécie *Ny. neivai* em um recipiente de volume 1.5 mL com a fibra DVB-CAR-PDMS inserida no headspace.

<https://www.dropbox.com/s/jrg4kyytzqynesl/V%C3%ADdeo%202.%20Comportamento%20de%20corte%20C%20Ny%20neivai%201.mp4?dl=0>

Vídeo 3. Comportamento de corte e acasalamento de um casal com cinco dias de idade da espécie *Ny. neivai* em um recipiente de volume 1.5 mL com a fibra DVB-CAR-PDMS inserida no headspace.

<https://www.dropbox.com/s/uiqhkyj4oyy23l/V%C3%ADdeo%203.%20Comportamento%20de%20corte%20e%20acasalamento%20Ny%20neivai%202.mp4?dl=0>

Figura 23. Diferenças entre as áreas totais dos isômeros do feromônio sexual de *Lu. longipalpis* para machos virgens com cinco dias após emergência, avaliados individualmente in vivo por HS-SPME-CG/MS.

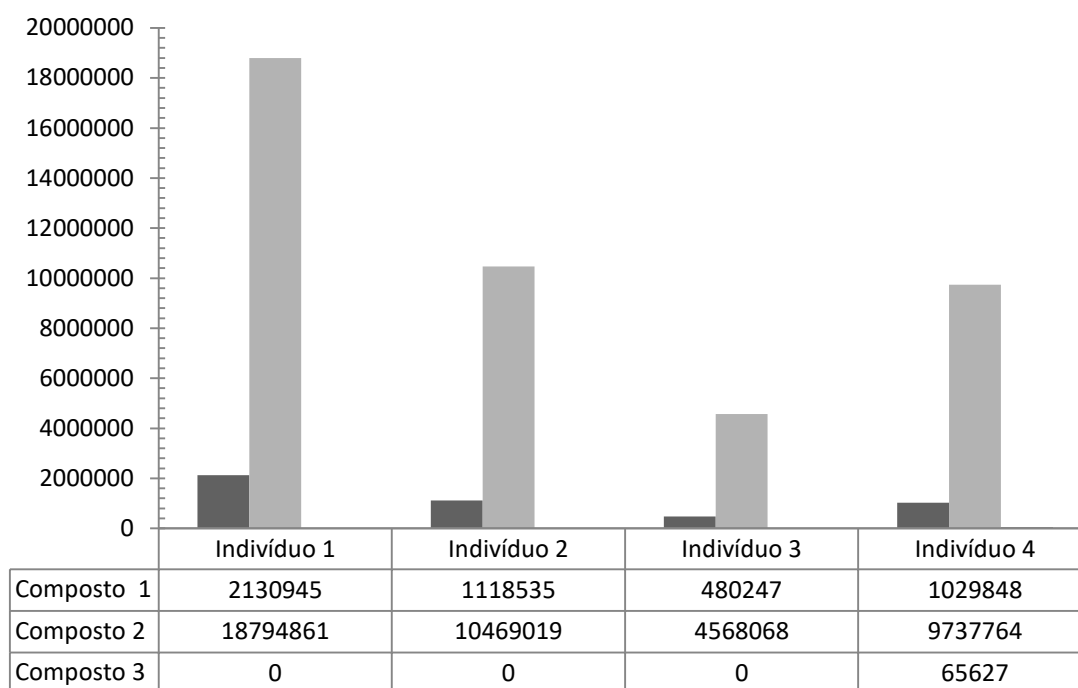


Fonte: Próprio autor.

Amostras submetidas à ação de calor. Pela técnica de HEADSPACE-SPME/CGMS foi possível confirmar a presença do feromônio sexual de *Lu. longipalpis* (9-metil-germacreno-B), inclusive com diferenças detectadas entre indivíduos. Porém, diferentemente da extração in vivo, as áreas totais dos compostos foram maiores (Figura 24). O resumo dos outros compostos detectados para *Lu. longipalpis* e para as outras espécies estão descritas na Tabela 8.

Como observação adicional é interessante registrar que durante as análises recebemos um macho da espécie *Lu. longipalpis* oriundo de Morada Nova – MG, e pela técnica de HS-SPME-CG/MS sob aquecimento, foi possível extrair dois feromônios descritos na literatura 9-metil-germacreno-B (Hamilton et al. 1996c) e o cembreno 1 ambos em um mesmo indivíduo (Hamilton et al. 2004) (Apêndice 2.4 e 2.5).

Figura 24. Diferenças entre as áreas totais dos três isômeros do feromônio sexual de *Lu. longipalpis* para machos virgens com cinco dias após emergência (apenas minutos de diferença), avaliados individualmente por HS-SPME-CG/MS sob aquecimento, 170° C x 45min.



Fonte: Próprio autor.

Tabela 8. Resumo dos compostos identificados por Headspace- SPME-CG/MS a temperatura ambiente e por aquecimento; em machos de *Lutzomyia longipalpis*, *Nyssomyia neivai*, *Nyssomyia whitmani*, *Pintomyia fischeri* e *Migonemyia. migonei*. (+) compostos detectados; (-) compostos não detectados. * Ensaio realizado com insetos de campo.

Composto	Biblioteca NIST e Wiley v229	IR literatura	IR calculado	<i>In vivo</i>					Aquecimento				
				<i>Lu.</i>	<i>Ny.</i>	<i>Ny.</i>	<i>Pi.</i>	<i>Mg.</i>	<i>Lu.</i>	<i>Ny.</i>	<i>Ny.</i>	<i>Pi.</i>	<i>Mg.</i>
				<i>longipalpis</i>	<i>neivai</i>	<i>whitmani</i>	<i>fischeri</i>	<i>migonei</i>	<i>longipalpis</i>	<i>neivai</i>	<i>whitmani</i>	<i>fischeri</i>	<i>migonei</i>
1	Hexanal	777	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
2	Heptanal	879	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
3	Octanal	995	997	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
4	Nonanal	1095	1095	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+
5	N-Decanal	1191	1191	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
6	Undecanal	1287	1287	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
7	9-metilgermacreno-B	1557	1555	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
8	Germacrona	1705	1599	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-

Fonte: Próprio autor.

5. DISCUSSÃO

A totalidade dos trabalhos realizados em ecologia química de flebotomíneos, relacionados à comunicação intraespecífica por meio de feromônios, é baseada em ensaios que buscam isolar os compostos voláteis e não voláteis por meio de técnicas de extração por solventes, submergindo os insetos ou as estruturas de interesse em hexano. São sete as espécies de flebotomíneos com feromônio sexual identificado ou caracterizado: *Ev. carmelinoi*, *Ev. lenti*, (Hamilton et al. 2002), *Lu. cruciata* (Serrano et al. 2016), *Lu. cruzi* (Brazil and Hamilton 2002), *Lu. lichyi* (Hamilton et al. 1999b), *Lu. longipalpis* (Hamilton et al. 1996a, Hamilton et al. 1996b, Hamilton et al. 1999c, Hamilton et al. 1999a, Brazil and Hamilton 2002, Hamilton et al. 2004, Hamilton et al. 2005) e *Pi. pessoai* (Ward et al. 1993). Em todos esses estudos foi utilizada técnica de extração por solventes. A mesma situação metodológica para o feromônio de oviposição, ácido dodecanóico, identificado em *Lu. longipalpis* (Dougherty and Hamilton 1997). Uma grande desvantagem deste tipo de ensaio é que, obrigatoriamente, os insetos são mortos, causando diminuição nas colônias. No presente trabalho, o comportamento dos insetos foi estudado o mais próximo ao que acontece na natureza, coletando por SPME os voláteis *in vivo* liberados durante os comportamentos de corte e oviposição. Foi possível, por meio dessa técnica, a extração e identificação do feromônio sexual de *Lu. longipalpis* analisando apenas um indivíduo da população de Panorama - SP produzindo 9-Metilgermacreno-B e de um indivíduo da população de Porteirinha - MG produzindo ambos os feromônios, cembreno-1 e 9-Metilgermacreno-B.

Os resultados obtidos no presente estudo, com a extração e análise dos voláteis *in vivo* em machos de *Lu. longipalpis* (9-metilgermacreno-B) por HS-SPME-CG/MS, permitiram observar diferenças no padrão de liberação de feromônio entre machos da mesma idade; além disso, foi possível evidenciar maiores áreas absolutas do feromônio quando os machos estiveram em presença de fêmeas. Corroborando nossos resultados, estas mesmas diferenças foram observadas em um estudo recente com machos de três populações de *Lu. longipalpis*, Campo grande-MT (9-metilgermacreno-B), Sobral 2S - CE (diterpeno) e Jacobina-BA (1S,3S,7R) -3-metil- α -himacheleno) pela técnica de aeração (Gonzalez et al. 2017). Os principais resultados do citado estudo foram: demonstração de diferentes padrões de liberação de feromônio sexual entre machos dos diferentes quimiotipos; entre indivíduos do mesmo quimiotipo e aumento da liberação de feromônio por machos na presença de fêmeas coespecíficas (Gonzalez et al. 2017).

Dessa forma, os resultados do presente trabalho apontam que a técnica de SPME-CG/MS mostrou-se adequada para ser utilizada na investigação de compostos voláteis em

flebotomíneos, porém considerando as particularidades químicas dos compostos voláteis para cada população ou espécie. Entretanto, a indicação química da presença de um composto em determinada espécie de inseto não determina a sua função biológica e, nessa etapa, são necessários ensaios comportamentais que exigem um grande número de insetos, obtidos em coletas de campo ou, preferencialmente, em colônias.

O estabelecimento das colônias de flebotomíneos em laboratório é uma tarefa que exige tempo e cuidado sendo que diferentes tentativas de captura destes insetos foram realizadas nesse trabalho, muitas delas sem êxito. Diversos aspectos atuam para o sucesso das coletas de flebotomíneos tais como os fatores abióticos, umidade, estiagem, temperaturas elevadas e os fatores bióticos como mudanças na vegetação por conta da ação antropogênica (Halimi et al. 2016, Oliveira et al. 2016, Venter et al. 2019). Esses fatores são capazes de afetar as espécies de maneiras diferentes, e em diferentes graus, resultando em modificações na diversidade e densidade dos insetos (Hirao et al. 2008). Foi considerada uma área de coleta ideal aquela em que as espécies alvo desse estudo estavam presentes em densidades elevadas e com fácil acesso, para manter uma provisão permanente de insetos de campo, aspecto primordial para o início de qualquer tentativa de estabelecimento de colônias de flebotomíneos em laboratório.

Em nossas coletas, *Ny. whitmani* foi encontrada em maior densidade, o que possibilitou a realização de um número maior de testes buscando avaliar a preferência de alimentação sanguínea para essa espécie/população, visto que *Ny. whitmani* trata-se de um complexo de espécies (Lainson 1988, Ready et al. 1997, Ready et al. 1998, Dias et al. 1999, Ishikawa et al. 1999, Margonari et al. 2004). Esta preferência foi avaliada apenas considerando o número de fêmeas alimentadas para cada uma das diferentes fontes sanguíneas apresentadas, sendo que, o número de ovos colocados por cada uma das fêmeas alimentadas não foi contabilizado. Duas das maiores dificuldades apresentadas após a alimentação sanguínea foram: a alta mortalidade e a baixa taxa de oviposição das fêmeas ingurgitadas quando estas foram individualizadas; dificuldades estas que já foram relatadas por diversos autores para o estabelecimento de uma colônia (Killick-Kendrick et al. 1977, Maroli et al. 1987, Killick-Kendrick et al. 1991, Oliveira et al. 2015).

No caso das espécies *Pi. fischeri* e *Mg. migonei*, capturadas em número reduzido (5-6 espécimes), a individualização das fêmeas após repasto sanguíneo praticamente inviabilizou a continuidade da colônia levando à mortalidade das fêmeas e a obtenção de um número reduzido de ovos. As larvas resultantes desses ovos, em número ainda mais reduzido, foram incapazes de continuar seu desenvolvimento, morrendo nas fases L1-L2 por conta dos fungos.

A criação das larvas de cada uma destas espécies em conjunto com *Ny. whitmani* (colônia mista) foi mais eficiente, possibilitando a obtenção de adultos.

Um dos fatores mais importantes durante a criação dos flebotomíneos é a dieta larval, da qual depende o sucesso da colônia (Souza et al. 1999). As larvas das três espécies, *Ny. whitmani*, *Pi. fischeri* e *Mg. migonei*, tiveram maior preferência pela ração de fígado liofilizado e terra de jardim (1:1), reduzindo em grande medida o aparecimento de fungos e a morte das larvas L1. Esta ração foi utilizada com sucesso por outros pesquisadores na criação de uma população de *Ny. whitmani* proveniente de Dourados, Mato Grosso do Sul (Ribeiro et al. 2015). Ribeiro e colaboradores verificaram também que a adição de solo, proveniente do local de coleta, incrementou o desenvolvimento das formas imaturas. Porém, no presente estudo as larvas foram criadas diretamente no gesso úmido, sem o uso de algum outro tipo de substrato.

Fêmeas das espécies *Pi. fischeri* e *Mg. migonei* resultantes da criação, em associação com *Ny. whitmani*, precisaram de dois ou três repastos sanguíneos antes de iniciarem a oviposição. Este comportamento é relacionado a uma fonte de nutrientes inadequada durante as fases larvais. Esta deficiência nutricional pode levar à redução da sobrevivência dos insetos adultos, afetando também diferentes processos reprodutivos como longevidade, síntese de proteínas para os ovos e ciclo gonotrófico (Briegel 1990, Hirao et al. 2008, Dmitriew and Rowe 2011). Os efeitos desta privação alimentar já foram investigados em *Drosophila melanogaster* (Dmitriew and Rowe 2011), e em algumas espécies de culicídeos, *Culex quinquefasciatus* (Epopa et al. 2018, Ong and Jaal 2018), *Anopheles gambiae*, *An. stephensi* (Takken et al. 2013), *An. coluzzii* (Epopa et al. 2018) e *Aedes aegypti* (Briegel 1990, Telang et al. 2006). Na espécie *Culex molestus* foi observado que o desempenho sexual dos machos foi afetado pela qualidade da dieta larval e a alimentação com açúcar (Kassim et al. 2012). Em flebotomíneos, o efeito da dieta larvária foi testado para duas populações de *Lu. longipalpis* (Brasil e Colômbia); ambas as populações se desenvolveram de maneira mais rápida e sincronizadas quando alimentadas com uma ração de fezes de animais e fígado liofilizado, do que os insetos criados em folhas em decomposição (Guzmán and Tesh 2000). Provavelmente, para as espécies de flebotomíneos relatadas nesse trabalho, a microbiota e o provável déficit nutricional das larvas afetou a sobrevivência das fêmeas, causando alta mortalidade das mesmas antes ou durante a oviposição, assim como a viabilidade dos ovos.

Durante os ensaios com SPME, apenas fêmeas grávidas das espécies *Ny. whitmani*, *Pi. fischeri* e *Mg. migonei* apresentaram o ácido dodecanóico e, consistentemente, este composto foi detectado em ovos recém liberados por essas espécies. Esta observação é interessante pois

condiz com o relatado para a espécie *Lu. longipalpis*, em que o ácido dodecanóico (feromônio de oviposição) foi detectado em fêmeas grávidas e glândulas acessórias. Bioensaios avaliando a atratividade deste composto para as três espécies acima citadas são necessários, mas infelizmente não foram realizados nesse trabalho pelas condições acima expostas.

Em *Ny. neivai*, onde apenas traços do ácido dodecanóico foram detectados, tanto as observações comportamentais como os ensaios de extração de compostos voláteis em ovos e fêmeas grávidas sugerem que esse composto não exerce um efeito significativo como atrativo ou estimulante da oviposição em fêmeas grávidas. Este mesmo comportamento foi relatado em ensaios de atratividade com olfatômetros em *Lu. renei* em que fêmeas grávidas não responderam significativamente aos extratos hexânicos de 100 – 200 ovos coespecíficos, havendo apenas uma leve atratividade quando foi utilizado um extrato de 1000 ovos (Alves et al. 2003). Em *Lu. shannoni*, tal qual *Ny. neivai*, não houve resposta significativa frente aos próprios ovos e nem ao ácido dodecanóico.

Além do ácido dodecanóico, alguns outros compostos, como heptanal, octanal, nonanal, decanal e undecanal foram identificados em fêmeas grávidas e ovos das espécies estudadas. Alguns destes aldeídos foram identificados como semioquímicos estimulantes ou atrativos para oviposição em espécies de culicídeos. Em ensaios de laboratório, infusões de uma gramínea, *Schoenoplectus acutus*, foram fortemente atrativas e estimulantes para a oviposição de fêmeas grávidas de *C. quinquefasciatus* e *C. tarsalis* (Du and Millar 1999b). Os voláteis liberados por infusões fermentadas da gramínea *Cynodon dactylon*, utilizados comumente como atrativos em armadilhas de captura de fêmeas grávidas de mosquitos, foram analisados por cromatografia gasosa acoplada a electroantenografia (GC-EAD), identificando nove compostos que elicitaram uma resposta significativa nas antenas de fêmeas grávidas: fenol, p-cresol, 4-etilfenol, indol, 3-metilindol, nonanal, 2-undecanona, 2-tridecanona, naphthaleno. Estes compostos foram levemente atrativos quando avaliados isoladamente, porém a mistura de todos os compostos foi fortemente atrativa e estimulou a oviposição em fêmeas grávidas de ambas as espécies (Du and Millar 1999a). Em flebotomíneos, extratos orgânicos de fezes de coelhos foram atrativos para fêmeas de *Lu. longipalpis* (Elnaiem and Ward 1992b, Dougherty et al. 1993); os compostos ativos desses extratos foram hexanal e 2-metil-2-butanol, que atuaram de forma sinérgica quando combinados com o ácido dodecanóico (Dougherty et al. 1995). Os aldeídos nonanal e decanal, com ação atrativa para machos e fêmeas de *Lu. longipalpis*, também foram identificados em compostos liberados por cães infectados com *L. infantum* (Magalhães-Junior et al. 2019).

Durante a extração *in vivo* de voláteis em machos de campo da espécie *Mg. migonei*, foi possível identificar um composto (chamado aqui de G76) com similaridade de 76% ao gemacrona e ao mirtenal (Apêndice 2.6). Mirtenal é um composto identificado como feromônio de coleópteros e presente em diferentes plantas (Pherobase, 2018). Interessantemente, germacrona foi o composto utilizado em laboratório para a síntese do 9-metilgermacreno-B, identificado como feromônio de *Lu. longipalpis* (Bergmann et al. 2009, Bray et al. 2009), tendo sido identificado na natureza em três gêneros da família Nyctaginaceae: *Acleisanthes*, *Mirabilis*, *Selinocarpus* e um gênero da família Geraniaceae: *Geranium*, a espécie *Geranium macrorrhizum* (gerânio) (Pherobase, 2018). Porém, é importante sinalizar que unicamente os machos de campo *Mg. migonei* apresentaram o composto G76; em fêmeas, brancos controle e machos F1 de laboratório não foi possível identificar o G76. Além disso, diferentemente dos machos de campo, que apresentaram comportamento de corte e acasalamento, os machos F1 não apresentaram este tipo de comportamento durante a extração de voláteis *in vivo* em presença das fêmeas.

Uma hipótese aventada para esses resultados (levando em conta a similaridade estrutural com a germacrona) é que os machos vindos de campo adquiram algum precursor nas plantas que eles se alimentam, porém unicamente os machos (e não as fêmeas) teriam a maquinaria metabólica para transformar este precursor em G76. Seguindo essa hipótese, os machos de laboratório não conseguiriam sintetizar o G76 por conta da dieta oferecida, tanto na fase larval quanto na fase adulta. Novas capturas de machos silvestres de *Mi. migonei*, e comparação com machos de laboratório, assim como a disponibilidade de padrão analítico para confirmar sua presença, poderiam ajudar a comprovar ou não essa hipótese.

Em nosso trabalho foi investigada a presença de feromônio sexual para *Ny. whitmani* e *Ny. neivai*, sendo que ambas as espécies não apresentam poros ou pápulas de liberação de feromônios. Não foi possível identificar nenhum composto volátil em machos para indicar a presença de feromônios. A presença destas pápulas foi sinalizada como um indicador da presença de feromônio ou uma característica vestigial (Hamilton et al. 2002). Porém em *Ph. papatasi*, espécie importante na transmissão de leishmaniose cutânea do Velho Mundo, experimentos comportamentais indicam a presença de feromônios em machos, mas sem detecção de poros ou pápulas. Em bioensaios comportamentais em tubo Y, fêmeas virgens de *Ph. papatasi* foram atraídas para grupos de machos e casais, mas não foram atraídas para outras fêmeas (Chelbi et al. 2011). Mais estudos são necessários para determinar se existem outros tipos de estruturas além das pápulas (Spiegel et al. 2016).

O comportamento de acasalamento de *Lu. longipalpis* foi analisado em laboratório com gaiolas acrílicas de 30x30x30, que continham um camundongo anestesiado. Os machos uma vez inseridos pousaram sobre o hospedeiro e exibiram comportamento tipo *lek*: batimento de asas, exibição e agressão, estabelecendo uma hierarquia para a cópula (Jarvis and Rutledge 1992). Resultados similares foram obtidos em ensaios de campo onde fêmeas e machos de *Lu. longipalpis* foram atraídos para locais onde os insetos tinham maior acesso aos hospedeiros. Os primeiros machos a chegar, produziram agregações ou *leks* ao redor dos hospedeiros, atraindo por sua vez, maior número de machos e fêmeas (Quinnell and Dye 1994a, b). Porém a formação de *lek* não é uma característica comum a todos os flebotomíneos; em *Ph. papatasi* não existe evidência desse comportamento. O comportamento de cortejo inicia-se com o toque da fêmea no macho, desencadeando neste, a flexão do abdômen e batimento das asas. Em *Ny. neivai*, da mesma forma que em *Ph. papatasi*, não foi observada a formação de *lek*, porém foram observadas algumas características exibidas por outras espécies de flebotomíneos durante o cortejo, como o batimento das asas, machos e fêmeas frente a frente durante o cortejo (*facing*), batimento do abdômen sobre o substrato (*dipping*) e movimento em círculo ou semicírculo em torno do mesmo ponto com batimento do abdômen (*circling* e *dipping*). Estes comportamentos são possivelmente ligados à liberação do feromônio ou à produção de som (Chelbi et al. 2012, Bray et al. 2014b). Pode-se concluir que, mesmo com similaridade de comportamentos de corte observados em outras espécies de flebotomíneos, nas análises do presente trabalho, com *Ny. neivai*, não foi possível verificar a presença de feromônio para esta espécie.

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS DE FUTUROS ESTUDOS

O SPME demonstrou ser altamente eficaz na coleta de compostos voláteis em flebotomíneos. Foi capaz de isolar o 9-metilgermacreno-B e o ácido dodecanóico; feromônio sexual e de oviposição em machos e fêmeas de *Lu. longipalpis*, respectivamente. Com relação ao feromônio sexual, demonstrou alta sensibilidade ao detectar diferenças nos padrões de liberação entre machos da mesma idade, *in vivo*.

A padronização da metodologia de extração de feromônio sexual, ajustada para a extração do 9-metilgermacreno-B (feromônio sexual em *Lutzomyia longipalpis*), pode ter produzido um viés, reduzindo a sensibilidade para a extração de compostos voláteis de natureza química diferente em outras espécies de flebotomíneos. Ensaio de padronização devem ser realizados para cada uma das espécies de flebotomíneos que sejam alvos de estudo, considerando cada um dos parâmetros avaliados neste trabalho, como tipo de fibra, temperatura e tempo de pré-equilíbrio, temperatura e tempo de extração.

Para a espécie *Mg. migonei*, a detecção de um composto apenas em machos de campo (G76) que apresentou 76% de similaridade com o composto germacroma, utilizado como precursor do feromônio sexual de *Lu. longipalpis*, merece mais investigações no intuito de avaliar sua possível função biológica como feromônio sexual. Considerando a importância epidemiológica de *Mg. migonei* na transmissão de *L. infantum chagasi*, a identificação do feromônio sexual poderia contribuir para as ações de vigilância e controle dessa espécie.

O ácido dodecanóico, feromônio de oviposição na espécie *Lu. longipalpis*, também foi encontrado em fêmeas pertencentes às espécies *Pi. fisheri*, *Mg. migonei* e *Ny. whitmani*, embora sejam necessários ensaios comportamentais com a finalidade de atribuir a função de feromônio de oviposição desse composto para estas espécies.

Os aldeídos: heptanal, octanal, decanal e nonanal foram detectados em fêmeas grávidas das espécies, *Pi. fisheri*, *Mg. migonei* e *Ny. whitmani*. Nonanal é relatado como atrativo de oviposição em algumas espécies de culicídeos. Consequentemente, novos estudos avaliando a função destes compostos como possíveis atrativos ou estimulantes da oviposição para estas espécies devem ser realizados.

Para a espécie *Ny. neivai*, apenas traços do ácido dodecanóico foram detectados e, de acordo com os resultados dos bioensaios, esse composto não desencadearia resposta biológica de atratividade para as fêmeas grávidas.

REFERÊNCIAS

- ACRE-SEMA, Secretaria de Estado de Meio Ambiente do Acre, 2010. Resumo educativo do Zoneamento Ecológico-Econômico do Acre: fase II. Secretaria de Estado de Meio Ambiente do Acre, R  o Branco. Disponível em: http://www.agencia.ac.gov.br/wp-content/uploads/2011/10/downloads_zee_resumo_educativo.pdf (acesso em: 1 May 2018)
- Agelopoulos, N. G., and L. J. Wadhams, 2000. Pheromones | Gas Chromatography, pp. 3796-3803. In I. D. Wilson (ed.), Encyclopedia of Separation Science. Academic Press, Oxford.
- Akaratovic, K.I., Kiser, J.P., 2017. First Record of *Culex Coronator* in Virginia, with Notes on Its Rapid Dispersal, Trapping Methods, and Biology. J. Am. Mosq. Control Assoc. 33, 225-228. Disponível em: <https://doi.org/10.2987/17-6668R.1>
- Akaratovic, K.I., Kiser, J.P., Gordon, S., Abadam, C.F., 2017. Evaluation of the Trapping Performance of Four Biogents AG Traps and Two Lures for the Surveillance of *Aedes albopictus* and Other Host-Seeking Mosquitoes. J. Am. Mosq. Control Assoc. 33, 108-115. Disponível em: <https://doi.org/10.2987/16-6596.1>
- Akhoundi, M., K. Kuhls, A. Cannet, J. Votypka, P. Marty, P. Delaunay, and D. Sereno, 2016. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. PLoS Negl. Trop. Dis. 10: 6 e0004349. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004349>
- Alexander, B., 2000. Sampling methods for phlebotomine sandflies. Med. Vet. Entomol. 14, 109-122. Disponível em: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2915.2000.00237.x>
- Alves, J. C. M., J. G. C. Hamilton, and R. P. Brazil., 2003. Oviposition response of *Lutzomyia (Lutzomyia) renei* (Martins, Falcão & Silva) (Diptera: Psychodidae) to extracts of conspecific eggs in laboratory bioassays. Entomotropica 18: 121-126.
- Allan S.A., Bernier U.R., Kline D.L., 2006. Attraction of mosquitoes to volatiles associated with blood. J. Vector Ecol. 31: 71-78. Disponível em: <http://digitalcommons.unl.edu/usdaarsfacpub/968>
- Andrade, A.J., Andrade, M.R., Dias, E.S., Pinto, M.C., Eiras,   .E., 2008. Are light traps baited with kairomones effective in the capture of *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia intermedia*? An evaluation of synthetic human odor as an attractant for phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). Mem Inst Oswaldo Cruz 103, 337-343. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762008000400004>
- Araujo-Pereira, T., de Pita-Pereira, D., Boit  , M.C., Melo, M., da Costa-Rego, T.A., Fuzari, A.A., Brazil, R.P., Britto, C., 2017. First description of *Leishmania (Viannia)* infection in *Evandromyia saulensis*, *Pressatia* sp. and *Trichophoromyia auraensis* (Psychodidae: Phlebotominae) in a transmission area of cutaneous leishmaniasis in Acre state, Amazon Basin, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 112, 75-78. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/007402760160283>

Arthur, C. L., and J. Pawliszyn, 1990. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Anal. Chem.* 62, Vol. 19, pp 2145-2148 Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1021/ac00218a019>

Ávila, M.M., Brilhante, A.F., Galati, E.A.B., Cardoso, A.S., Brazil, R.P., 2018. *Sciopemyia vattierae* (Le Pont & Desjeux, 1992) (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae): new record from Acre state, Brazil. *Check List* 14, 585-589. Disponível em: <https://doi.org/10.15560/14.4.585414>

Azevedo, A.C., Costa, S.M., Pinto, M.C., Souza, J.L., Cruz, H.C., Vidal, J., Rangel, E.F., 2008. Studies on the sandfly fauna (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) from transmission areas of American Cutaneous Leishmaniasis in state of Acre, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103, 760-767. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762008000800003>

Barth, R., 1961. Sobre o aparelho genital interno do macho de *Phlebotomus longipalpis* (Lutz et Neiva, 1912): (Diptera, Psychodidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 59, 23-36. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02761961000100003>

Bates, D., Mächler, M., Bolker, B., Walker, S., 2015a. Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. *J. Stat. Softw.* 67, 48. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.18637/jss.v067.i01>

Batista, E.P.A., Ngowo, H.S., Opiyo, M., Shubis, G.K., Meza, F.C., Okumu, F.O., Eiras, A.E., 2017. Semi-field assessment of the BG-Malaria trap for monitoring the African malaria vector, *Anopheles arabiensis*. *PLoS One* 12, 10. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186696>

Beavers, G.M., Hanafi, H.A., Dykstra, E.A., 2004. Evaluation of 1-octen-3-ol and carbon dioxide as attractants for *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) in southern Egypt. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 20, 130-133.

Bentley, M. D., and J. F. Day, 1989. Chemical Ecology and Behavioral Aspects of Mosquito Oviposition. *Annu. Rev. Entomol.* 34, 401-421. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev.en.34.010189.002153>

Bergmann, J., J. A. F. P. Villar, M. F. Flores, and P. H. G. Zarbin. 2009. Synthesis of Pheromones: Highlights from 2005-2007. *Curr. Org. Chem.* 13. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.2174/138527209788167222>

Biogents, 2018. Artificial human scents. Disponível em: <https://eu.biogents.com/artificial-human-skin-scent/> (acesso em: 01 May 2018).

Borges, D.A., Molina, S.M.G., Pinto, M.C., Galati, E.A.B., Cesario, M., Ortiz, D.G.S., 2017. First Record of *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) on the Trinational Frontier (Brazil-Peru-Bolivia) of South-Western Amazonia. *J. Med. Entomol.* 54, 1425 – 1429. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jme/tjx086>

Bosch, O.J., Geier, M., Boeckh, J., 2000. Contribution of Fatty Acids to Olfactory Host Finding of Female *Aedes aegypti*. *Chem. Senses* 25, 323-330. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.chemse.a014042>

Bray, D. P., and J. G. Hamilton, 2007. Host odor synergizes attraction of virgin female *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). J. Med. Entomol. 44, 779-787. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1093/jmedent/44.5.779>

Bray, D., G. Alves, M. Dorval, R. Brazil, and J. Hamilton, 2010. Synthetic sex pheromone attracts the leishmaniasis vector *Lutzomyia longipalpis* to experimental chicken sheds treated with insecticide. Parasit. Vectors 3, 16. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1756-3305-3-16>

Bray, D., V. Carter, G. B. Alves, R. P. Brazil, K. K. Bandi, and J. G. C. Hamilton, 2014a. Synthetic Sex Pheromone in a Long-Lasting Lure Attracts the Visceral Leishmaniasis Vector, *Lutzomyia longipalpis*, for up to 12 Weeks in Brazil. PLoS Negl. Trop. Dis. 8, e2723. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002723>

Bray, D. P., K. K. Bandi, R. P. Brazil, A. G. Oliveira, and J. G. Hamilton, 2009. Synthetic sex pheromone attracts the leishmaniasis vector *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) to traps in the field. J. Med. Entomol. 46, 428-434. Disponível em: <https://doi.org/10.1603/033.046.0303>

Bray, D. P., K. Yaman, B. A. Underhill, F. Mitchell, V. Carter, and J. G. C. Hamilton. 2014b. **Multi-modal Analysis of Courtship Behaviour in the Old World Leishmaniasis Vector *Phlebotomus argentipes***. PLoS Negl. Trop. Dis. 8(2014): e3316. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003316>

Brazil, R. P., and J. G. Hamilton, 2002. Isolation and identification of 9-methylgermacrene-B as the putative sex pheromone of *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira, 1938) (Diptera: Psychodidae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz 97, 435-436. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762002000300030>

Brazil, R. P., 2013. The dispersion of *Lutzomyia longipalpis* in urban areas. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 46, 263-264. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0101-2013>

Brazil, R.P., Rodrigues, A.A.F., Filho, J.D.A., 2015. Sand Fly Vectors of *Leishmania* in the Americas - A Mini Review. Entomol. Ornithol. Herpetol. 4, 144. Disponível em: <https://doi:10.4172/2161-0983.1000144>

Briegel, H., 1990. Metabolic relationship between female body size, reserves, and fecundity of *Aedes aegypti*. J. Insect Physiology 36, 165-172. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(90\)90118-Y](https://doi.org/10.1016/0022-1910(90)90118-Y)

Brown Jr, W. L., T. Eisner, and R. H. J. B. Whittaker, 1970. Allomones and kairomones: transspecific chemical messengers. 20, 21-22. Disponível em: <https://doi.org/10.2307/1294753>

Cameron, M. M., F. A. C. Pessoa, A. W. Vasconcelos, and R. D. Ward, 1995a. Sugar meal sources for the phlebotomine sandfly *Lutzomyia longipalpis* in Ceará State, Brazil. Med. Vet. Entomol. 9, 263-272. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.1995.tb00132.x>

- Cameron, M. M., P. J. M. Milligan, A. Llanos-Cuentas, and C. R. Davies, 1995b. An association between phlebotomine sandflies and aphids in the Peruvian Andes. *Med. Vet. Entomol.* 9, 127-132. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.1995.tb00168.x>
- Campbell-Lendrum, D.H., Pinto, M.C., Brandão-Filho, S.P., De Souza, A.A., Ready, P.D., Davies, C.R., 1999. Experimental comparison of anthropophily between geographically dispersed populations of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae). *Med. Vet. Entomol* 13, 299-309. Disponível em: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2915.1999.00174.x>
- Casanova, C., D. Natal, and F. A. Santos, 2009. Survival, population size, and gonotrophic cycle duration of *Nyssomyia neivai* (Diptera: Psychodidae) at an endemic area of American cutaneous leishmaniasis in southeastern Brazil. *J. Med. Entomol.* 46, 42-50. Disponível em: <https://doi.org/10.1603/033.046.0106>
- Castillo, A., A. K. Serrano, O. F. Mikery, and J. Pérez, 2015. Life history of the sand fly vector *Lutzomyia cruciata* in laboratory conditions. *Med. Vet. Entomol.* 29, 393-402. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/mve.12127>
- Chaniotis, B. H., 1986. Successful colonization of the Sand Fly *Lutzomyia trapidoi* (Diptera: Psychodidae), with enhancement of its gonotrophic activity. *J. Med. Entom.* 23, 163-166. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jmedent/23.2.163>
- Chaniotis, B.N., 1983. Improved Trapping of Phlebotomine Sand Flies (Diptera: Psychodidae) in Light Traps Supplemented with Dry Ice in a Neotropical Rain Forest. *J. Med. Entomol.* 20, 222-223. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jmedent/20.2.222>
- Chelbi, I., E. Zhioua, and J. G. Hamilton. 2011. Behavioral evidence for the presence of a sex pheromone in male *Phlebotomus papatasi scopoli* (Diptera: Psychodidae). *J. Med. Entomol.* 48, 518-525. Disponível em: <https://doi.org/10.1603/ME10132>
- Chelbi, I., D. P. Bray, and J. G. Hamilton. 2012. Courtship behaviour of *Phlebotomus papatasi* the sand fly vector of cutaneous leishmaniasis. *Parasit. Vectors* 5, 179. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-179>
- Cilek, J.E., Hallmon, C.F., Johnson, R., 2011. Semi-Field Comparison of the Bg-Lure, Nonanal, and 1-Octen-3-ol to Attract Adult Mosquitoes In Northwestern Florida. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 27, 393-397. Disponível em: <https://doi.org/10.2987/11-6151.1>
- Claborn, D. M., 2010. The biology and control of leishmaniasis vectors. *J. Glob. Infect. Dis.* 2, 127-134. Disponível em: <https://doi.org/10.4103/0974-777X.62866>
- Cocchiararo-Bastias, L. M., S. J. Mijailovsky, G. M. Calderon-Fernández, A. N. Lorenzo Figueiras, and M. P. Juárez, 2011. Epicuticle Lipids Mediate Mate Recognition in *Triatoma infestans*. *J. Chem. Ecol.* 37, 246-252. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10886-011-9927-2>
- Cork, A., Park, K.C., 1996. Identification of electrophysiologically-active compounds for the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*, in human sweat extracts. *Med. Vet. Entomol.* 10, 269-276. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.1996.tb00742.x>

Coutinho, J. d., and M. Barretto, 1941. Dados bionômicos sobre o “*Phlebotomus fischeri*” Pinto, 1926 (Diptera, Psychodidae). Rev. Bras. Biol. 1, 423-429.

Desjeux, P., 1996. Leishmaniasis: Public health aspects and control. Clin. Dermatol. 14, 417-423. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0738-081X\(96\)00057-0](https://doi.org/10.1016/0738-081X(96)00057-0)

Desjeux, P., 2004. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 27, 305-318. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2004.03.004>

Dias, E. S., C. L. Fortes-Dias, J. C. Miranda, P. M. Linardi, R. A. Barata, R. P. Brazil, and S. B. Filho, 1999. Morphometric and Phenetic Studies of Five Geographical Populations of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) in Brazil. J. Med. Entomol. 36, 846-850. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jmedent/36.6.846>

Dias-Sversutti, A. d. C., R. B. d. L. Scodro, K. R. Reinhold-Castro, H. C. Neitzke, and U. Teodoro, 2007. Estudo preliminar da preferência alimentar de *Nyssomyia neivai* (Pinto) e *Nyssomyia whitmani* (Antunes & Coutinho) (Diptera: Psychodidae) em área rural do Paraná. Neotrop. Entomol. 36, 953-959. Disponível em: <http://doi.org/10.1590/s1519-566x2007000600019>

Dmitriew, C., and L. Rowe, 2011. The Effects of Larval Nutrition on Reproductive Performance in a Food-Limited Adult Environment. PLOS ONE 6, e17399. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017399>

Dougherty, M., R. Ward, and G. Hamilton, 1992. Evidence for the accessory glands as the site of production of the oviposition attractant and/or stimulant of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). J. Chem. Ecol. 18, 1165-1175. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF00980071>

Dougherty, M. J., J. G. C. Hamilton, and R. D. Ward, 1993. Semiochemical mediation of oviposition by the phlebotomine sandfly *Lutzomyia longipalpis*. Med. Vet. Entomol. 7: 219-224. Disponível em: <http://doi.org/10.1111/j.1365-2915.1993.tb00680.x>

Dougherty, M. J., J. G. C. Hamilton, and R. D. Ward, 1994. Isolation of oviposition pheromone from the eggs of the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. Med. Vet. Entomol. 8, 119-124. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.1994.tb00150.x>

Dougherty, M. J., P. M. Guerin, and R. D. Ward, 1995. Identification of oviposition attractants for the sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in volatiles of faeces from vertebrates. Physiol. Entomol. 20: 23-32. Disponível em: <http://doi.org/10.1111/j.1365-3032.1995.tb00797.x>

Dougherty, M., and G. Hamilton, 1997. Dodecanoic Acid is the oviposition pheromone of *Lutzomyia longipalpis*. J. Chem. Ecol. 23, 2657-2671. Disponível em: <http://doi.org/10.1023/a:1022598523803>

Dougherty, M. J., P. M. Guerin, R. D. Ward, and J. G. C. Hamilton, 1999. Behavioural and electrophysiological responses of the phlebotomine sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera:

Psychodidae) when exposed to canid host odour kairomones. *Physiol. Entomol.* 24, 251-262. Disponível em: <http://doi.org/10.1046/j.1365-3032.1999.00139.x>

Du, Y.-j., and J. G. Millar, 1999a. Electroantennogram and Oviposition Bioassay Responses of *Culex quinquefasciatus* and *Culex tarsalis* (Diptera: Culicidae) to Chemicals in Odors from Bermuda Grass Infusions. *J. Med. Entomol.* 36(1999): 158-166. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jmedent/36.2.158>

Du, Y., and J. G. Millar, 1999b. Oviposition responses of gravid *Culex quinquefasciatus* and *Culex tarsalis* to bulrush (*Schoenoplectus acutus*) infusions. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 15, 500-509.

ElNaiem, D., and R. D. Ward, 1990. An oviposition pheromone on the eggs of sandflies (Diptera: Psychodidae). *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 84, 456-457. Disponível em: [http://doi.org/10.1016/0035-9203\(90\)90359-M](http://doi.org/10.1016/0035-9203(90)90359-M)

Elnaiem, D.-E. A., and R. D. Ward, 1991. Response of the sandfly *Lutzomyia longipalpis* to an oviposition pheromone associated with conspecific eggs. *Med. Vet. Entomol.* 5, 87-91. Disponível em: <http://doi.org/10.1111/j.1365-2915.1991.tb00525.x>

Elnaiem, D. A., and R. D. Ward, 1992a. The thigmotropic oviposition response of the sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) to crevices. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 86, 425-430. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/00034983.1992.11812688>

Elnaiem, D. E., and R. D. Ward, 1992b. Oviposition attractants and stimulants for the sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *J. Med. Entomol.* 29, 5-12. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jmedent/29.1.5>

Epopa, P. S., H. Maiga, D. F. d. S. Hien, R. K. Dabire, R. S. Lees, J. Giles, F. Tripet, T. Baldet, D. Damiens, and A. Diabate, 2018. Assessment of the developmental success of *Anopheles coluzzii* larvae under different nutrient regimes: effects of diet quality, food amount and larval density. *Malar. J.* 17, 377-377. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12936-018-2530-z>

Feliciangeli, M. D., N. Rodriguez, Z. De Guglielmo, and A. Rodriguez, 1999. The re-emergence of American visceral leishmaniasis in an old focus in Venezuela. II. Vectors and parasites. *Parasite (Paris, France)* 6, 113-120. Disponível em: <https://doi.org/10.1051/parasite/1999062113>

Ferreira, L., L. Deane, and O. Mangabeira Filho, 1938. Sobre a biologia dos flebótomos das zonas de leishmaniose visceral ora em estudo no Pará. *O Hospital* 14, 1079-1082.

Forattini, O.P., 1973. Técnicas de laboratório. In *Entomologia Médica. Psychodidae. Phlebotominae. Leishmanioses. Bartonelose. Blucher & USP (Eds), São Paulo.* p, 634.

Galati, E.A., 2018. Classificação, morfologia, terminologia e identificação de Adultos, Apostila de Bioecologia e Identificação de Phlebotomine. Departamento de Epidemiologia, Faculdade de Saúde Pública.USP, São Paulo., pp. 131. Disponível em: <http://www.fsp.usp.br/egalati/index.php/2018/07/24/materiais/> (accessed 01 May, 2018).

Garboui, S. S., A. K. Borg-Karlson, and K. Pålsson, 2009. Tick repellent properties of three Libyan plants. J. Med. Entomol. 46, 1415-1419. Disponível em: <https://doi.org/10.1603/033.046.0623>

Geier, M., Bosch, O.J., Boeckh, J., 1999. Influence of odour plume structure on upwind flight of mosquitoes towards hosts. J Exp. biology 202, 1639-1648. Disponível em: <http://jeb.biologists.org/content/202/12/1639.article-info>

Geier, M., Rose, A., Gunewald, J., Jones, O., 2006. New mosquito traps improve the monitoring of disease vectors. Int Pest Control 48, 124-126.

Gibson, G. & Torr, S.J, 1999. Visual and olfactory responses of haematophagous Diptera to host stimuli. Med Vet Entomol, 13, 2-2. Disponível em: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2915.1999.00163.x>

Gil, L.H., Basano, S.A., Souza, A.A., Silva, M.G., Barata, I., Ishikawa, E.A., Camargo, L.M., Shaw, J.J., 2003. Recent observations on the sand fly (Diptera: Psychodidae) fauna of the State of Rondônia, Western Amazônia, Brazil: the importance of *Psychodopygus davisi* as a vector of zoonotic cutaneous leishmaniasis. Mem Inst Oswaldo Cruz 98, 751-755. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762003000600007>

Gillies, M.T., 1980. The role of carbon dioxide in host-finding by mosquitoes (Diptera: Culicidae): a review. Bull. Ent. Res. 70, 525-532. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S0007485300007811>

Gonzalez, M. A., K. K. Bandi, M. J. Bell, R. P. Brazil, E. Dilger, A. Guerrero, O. Courtenay, and J. G. C. Hamilton, 2017. A temporal comparison of sex-aggregation pheromone gland content and dynamics of release in three members of the *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) species complex. PLoS Negl. Trop. Dis. 11, e0006071. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006071>

Goulart, T. M., C. F. de Castro, V. E. Machado, F. B. da Rocha Silva, and M. C. Pinto, 2015. Techniques to improve the maintenance of a laboratory colony of *Nyssomyia neivai* (Diptera: Psychodidae). Parasit Vectors 8, 423. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1035-7>

Goulart, T. M., F. B. da Rocha Silva, V. E. Machado, W. H. C. Oliveira, C. F. de Castro, M. V. N. Rodrigues, and M. C. Pinto, 2017. Breeding protocol for the sand fly *Nyssomyia neivai* (Diptera: Psychodidae) in laboratory conditions. Acta Trop. 174, 102-105. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.07.010>

Granados-Echegoyen, C., R. Perez-Pacheco, M. Soto-Hernandez, J. Ruiz-Vega, L. Lagunez-Rivera, N. Alonso-Hernandez, and R. Gato-Armas, 2014. Inhibition of the growth and development of mosquito larvae of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) treated with extract from leaves of *Pseudocalymma alliaceum* (Bignoniaceae). Asian Pac. J. Trop. Med. 7, 594-601. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(14\)60101-2](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(14)60101-2)

Greenfield, M. D., 2002. Signalers and receivers: mechanisms and evolution of arthropod communication, Oxford University Press.

Grimaldi Jr, G., H. Momen, R.D. Naiff, D. Mcmhon-Pratt & T.V. Barrett, 1991. Characterization and classification of leishmanial parasites from humans, wild mammals, and sand flies in the Amazon Region of Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 44, 645-661. Disponível em: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1991.44.645>

Gu, H. J., S. S. Cheng, C. Y. Lin, C. G. Huang, W. J. Chen, and S. T. Chang, 2009. Repellency of essential oils of *Cryptomeria japonica* (Pinaceae) against adults of the mosquitoes *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera:Culicidae). *J. Agric. Food Chem.* 57, 11127-11133. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jf9024486>

Guzmán, H., and R. B. Tesh, 2000. Effects of temperature and diet on the growth and longevity of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae). *Biomédica* 20(3), 190-199. Disponível em: <https://doi.org/10.7705/biomedica.v20i3.1060>

Halimi, M., Z. Z. Cheghabaleki, M. J. Modrek, and M. Delavari, 2016. Temporal Dynamics of Phlebotomine Sand Flies Population in Response to Ambient Temperature Variation, Bam, Kerman Province of Iran. *Ann. Glob. Health.* 82, 824-831. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aogh.2016.07.009>

Hamilton, J. G., and T. M. Ramsoondar, 1994. Attraction of *Lutzomyia longipalpis* to human skin odours. *Med. Vet. Entomol.* 8, 375-380. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.1994.tb00101.x>

Hamilton, J. G. C., M. J. Dougherty, and R. D. Ward, 1994. Sex pheromone activity in a single component of tergal gland extract of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) from Jacobina, Northeastern Brazil. *J. Chem. Ecol.* 20, 141-151. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF02065997>

Hamilton, J. G., G. W. Dawson, and J. A. Pickett, 1996a. 3-Methyl-alpha-himachalene: Proposed structure for novel homosesquiterpene sex pheromone of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) from Jacobina, Brazil. *J. Chem. Ecol.* 22, 2331-2340. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF02029550>

Hamilton, J. G., R. D. Ward, M. J. Dougherty, R. Maignon, C. Ponce, E. Ponce, H. Noyes, and R. Zeledon, 1996b. Comparison of the sex-pheromone components of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera:Psychodidae) from areas of visceral and atypical cutaneous leishmaniasis in Honduras and Cost Rica. *Ann Trop Med Parasitol.* 90, 533-541. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/00034983.1996.11813079>

Hamilton, J. G. C., G. W. Dawson, and J. A. Pickett, 1996c. 9-Methylgermacrene-B; proposed structure for novel homosesquiterpene from the sex pheromone glands of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) from Lapinha, Brazil. *J. Chem. Ecol.* 22, 1477-1491. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF02027726>

Hamilton, J. G. C., H. C. Ibbotson, A. M. Hooper, and J. A. Pickett, 1999. 9-Methylgermacrene-B is confirmed as the sex pheromone of the sandfly *Lutzomyia longipalpis* from Lapinha, Brazil, and the absolute stereochemistry defined as S. *Chem. Comm.* 23, 2335-2336. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/A907910F>

Hamilton, J. G. C., R. P. Brazil, E. D. Morgan, and B. Alexander, 1999b. Chemical analysis of oxygenated homosesquiterpenes: a putative sex pheromone from *Lutzomyia lichyi* (Diptera: Psychodidae). Bull Entomol. Res. 89, 139-145. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S000748539900022X>

Hamilton, J. G. C., A. M. Hooper, J. A. Pickett, K. Mori, and S. Sano, 1999c. 3-Methyl- α -himachalene is confirmed, and the relative stereochemistry defined, by synthesis as the sex pheromone of the sandfly *Lutzomyia longipalpis* from Jacobina, Brazil. Chem. Commun. 4, 355-356. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/A900242A>

Hamilton, J. G., and D. A. El Naiem, 2000. Sugars in the gut of the sandfly *Phlebotomus orientalis* from Dinder National Park, Eastern Sudan. Med. Vet. Entomol. 14, 64-70. Disponível em: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2915.2000.00208.x>

Hamilton, J. G., R. P. Brazil, D. Campbell-Lendrum, C. R. Davies, D. W. Kelly, F. A. Pessoa, and R. G. de Queiroz, 2002. Distribution of putative male sex pheromones among *Lutzomyia* sandflies (Diptera: Psychodidae). Ann Trop Med Parasitol. 96, 83-92. Disponível em: <https://doi.org/10.1179/000349802125000547>

Hamilton, J. G. C., R. P. Brazil, and R. Maingon, 2004. A Fourth Chemotype of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) from Jaíba, Minas Gerais State, Brazil. J. Med. Entomol. 41, 1021-1026. Disponível em: <https://doi.org/10.1603/0022-2585-41.6.1021>

Hamilton, J. G., R. D. Maingon, B. Alexander, R. D. Ward, and R. P. Brazil, 2005. Analysis of the sex pheromone extract of individual male *Lutzomyia longipalpis* sandflies from six regions in Brazil. Med. Vet. Entomol. 19, 480-488. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2005.00594.x>

Hamilton, J. G., 2008. Sandfly pheromones. Their biology and potential for use in control programs. Parasite (Paris, France) 15, 252-256. Disponível em: <https://doi.org/10.1051/parasite/2008153252>

Hanson, W. J., 1961. The breeding places of *Phlebotomus* in Panama (Diptera, Psychodidae). Ann. Entomol. Soc. Am. 54, 317-322. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/aesa/54.3.317>

Harre, J. G., K. M. Dorsey, K. L. Armstrong, J. R. Burge, and K. E. Kinnamon, 2001. Comparative fecundity and survival rates of *Phlebotomus papatasi* sandflies membrane fed on blood from eight mammal species. Med. Vet. Entomol. 15, 189-196. Disponível em: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2915.2001.00278.x>

Hirao, T., M. Murakami, J. Iwamoto, H. Takafumi, and H. Oguma, 2008. Scale-dependent effects of windthrow disturbance on forest arthropod communities. Ecol. Res. 23, 189-196. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11284-007-0370-3>

Hoel, D.F., Kline, D.L., Hogsette, J.A., Bernier, U.R., El-Hossary, S.S., Hanafi, H.A., Watany, N., Fawaz, E.Y., Furman, B.D., Obenauer, P.J., SzumLas, D.E., 2010. Efficacy of Commercial Mosquito Traps in Capturing Phlebotomine Sand Flies (Diptera: Psychodidae) in Egypt. J. Med. Entomol. 47, 1179-1184. Disponível em: <https://doi.org/10.1603/ME10144>

Hooper, A. M., J. B. Farcet, N. P. Mulholland, and J. A. Pickett, 2006. Synthesis of 9-methylgermacrene B, racemate of the sex pheromone of *Lutzomyia longipalpis* (Lapinha), from the renewable resource, *Geranium macrorrhizum* essential oil. Green Chem. 8, 513-515. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/B602875F>

Hummel, H. E., and T. A. Miller, 1984. Techniques in Pheromone Research. In: Techniques for Extracting and Collecting Sex Pheromones from Live Insects and from Artificial Sources. Springer, New York, NY, 1, 223-286. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-1-4612-5220-7>

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), 2018. Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br>. (acesso em: Jan. 2018).

Ishikawa, E., P. Ready, A. d. Souza, J. Day, E. Rangel, C. Davies, and J. Shaw, 1999. A Mitochondrial DNA Phylogeny Indicates Close Relationships between Populations of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) from the Rain-forest Regions of Amazônia and Northeast Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 94, 339-345. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02761999000300010>

Jaenson, T. G., K. Palsson, and A. K. Borg-Karlson, 2005. Evaluation of extracts and oils of tick-repellent plants from Sweden. Med. Vet. Entomol. 19, 345-352. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2005.00578.x>

Jaenson, T. G., K. Palsson, and A. K. Borg-Karlson, 2006. Evaluation of extracts and oils of mosquito (Diptera: Culicidae) repellent plants from Sweden and Guinea-Bissau. J. Med. Entomol. 43, 113-119. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jmedent/43.1.113>

Jarvis, E. K., and L. C. Rutledge, 1992. Laboratory Observations on Mating and Leklike Aggregations in *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). J. Med. Entomol. 29, 171-177. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jmedent/29.2.171>

Junnila, A., G. C. Muller, and Y. Schlein, 2011a. Attraction of *Phlebotomus papatasi* to common fruit in the field. J. Vector Ecol. 36 Suppl 1: S206-211. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1948-7134.2011.00132.x>

Junnila, A., G. C. Müller, and Y. Schlein, 2011b. Identification of plant tissues from the gut of *Phlebotomus papatasi* by DNA analysis. Acta Trop. 117, 14-18. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2010.08.019>

Karlson, P., and M. Luscher, 1959. 'Pheromones': a New Term for a Class of Biologically Active Substances. Nature 183, 55.

Kasap, Ö.E., Belen, A., Kaynas, S., Simsek, F.M., Biler, L., Ata, N., Alten, B., 2009. Activity Patterns of Sand Fly (Diptera: Psychodidae) Species and Comparative Performance of Different Traps in an Endemic Cutaneous Leishmaniasis Focus in Cukurova Plain, Southern Anatolia, Turkey. Acta Vet. Brno 78, 327-335. Disponível em: <https://doi.org/10.2754/avb200978020327>

Kasili, S., Kutima, H., Mwandawiro, C., Ngumbi, P.M., Anjili, C.O., 2009. Comparative attractiveness of CO₂-baited CDC light traps and animal baits to *Phlebotomus duboscqi* sandflies. J. Vector Borne Dis. 46, 191-196.

Kassim, N. F. A., C. E. Webb, and R. C. Russell, 2012. The importance of Males: Larval Diet and Adult Sugar Feeding Influences Reproduction in *Culex molestus*. J. Am. Mosq. Control Assoc, 28, 312-316. Disponível em: <https://doi.org/10.2987/12-6274R.1>

Killick-Kendrick, R., A. J. Leaney, and P. D. Ready, 1977. The Establishment, Maintenance and Productivity of a Laboratory Colony of *Lutzomyia Longipalpis* (Diptera: Psychodidae). J. Med. Entomol. 13, 429-440. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jmedent/13.4-5.429>

Killick-Kendrick, R., 1987. Breeding places of *Phlebotomus ariasi* in the cevennes focus of leishmaniasis in the south of France. Parassitologia 29, Suppl: 181-191.

Killick-Kendrick, R., 1990. Phlebotomine vectors of the Leishmaniasis: A review. Med. Vet. Entomol. 4, 1-24. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.1990.tb00255.x>

Killick-Kendrick, R., M. Maroli, and M. Killick-Kendrick, 1991. Bibliography on the colonization of phlebotomine sandflies. Parassitologia 33, Suppl:321-33.

Killick-Kendrick, R., 1999. The biology and control of phlebotomine sand flies. Clin Dermatol. 17, 279-289. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0738-081X\(99\)00046-2](https://doi.org/10.1016/S0738-081X(99)00046-2)

Knudsen, A.B., Lewis, D.J., Tesh, R.B., Rudnick, A., Jeffery, J., Singh, I., 1979. Phlebotomine Sand Flies (Diptera: Psychodidae) from a Primary Hill Forest in West Malaysia.. J. Med. Entomol. 15, 286-291. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jmedent/15.3.286>

Kolb, B., and L. S. Ettre, 2006. Static headspace-gas chromatography: theory and practice, John Wiley & Sons. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/0471914584>

Krockel, U., Rose, A., Eiras, A.E., Geier, M., 2006. New tools for surveillance of adult yellow fever mosquitoes: comparison of trap catches with human landing rates in an urban environment. J Am Mosq Control Assoc. 22, 229-238. Disponível em: [https://doi.org/10.2987/8756-971X\(2006\)22\[229:NTFSOA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2987/8756-971X(2006)22[229:NTFSOA]2.0.CO;2)

Kumar, V., A. Rama, S. Kesari, G. S. Bhunia, D. S. Dinesh, and P. Das, 2013. Oviposition behaviour of *Phlebotomus argentipes* - a laboratory-based study. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 108, 1065-1067. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0074-0276130003>

Kurosawa, S., and K. Mori, 2000. Synthesis of (S)-9-Methylgermacrene-B, the Male-Produced Sex Pheromone of the Sandfly *Lutzomyia longipalpis* from Lapinha, Brazil, and Its (R)-Isomer. Eur. J. Org. Chem. 6, 955-962. Disponível em: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-0690\(200003\)2000:6<955::AID-EJOC955>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-0690(200003)2000:6<955::AID-EJOC955>3.0.CO;2-Y)

Lainson, R., Shaw, J.J., 1968. Leishmaniasis in Brazil: I. Observations on enzootic rodent leishmaniasis—incrimination of *Lutzomyia flaviscutellata* (mangabeira) as the vector in the lower amazonian basin. Trans R Soc Trop Med Hyg. 62, 385-395. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(68\)90090-4](https://doi.org/10.1016/0035-9203(68)90090-4)

Lainson, R., 1988. Ecological interactions in the transmission of the leishmaniasis. *Philos. Trans. Royal Soc. B, Biol Sci* 321, 1207, 389-404. Disponível em: <https://doi.org/10.1098/rstb.1988.0099>

Lainson, R., and E. F. Rangel, 2005. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 100(8), 811-827. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762005000800001>

Lane, R. P., and R. D. Ward, 1984. The morphology and possible function of abdominal patches in males of the two forms of the leishmaniasis vector *Lutzomyia longipalpis*. *Cahiers d'Office de la Recherche Scientifique et Technique Outre-mer, sér. Ent. méd. et Parasitol.* 22, 245-249.

Lane, R., A. Phillips, D. H. Molyneux, G. Procter, and R. D. Ward, 1985. Chemical analysis of the abdominal glands of two forms of *Lutzomyia longipalpis*: site of a possible sex pheromone? *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 79(2), 225-229. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/00034983.1985.11811912>

Lane, R. P., and D. S. Bernardes, 1990. Histology and ultrastructure of pheromone secreting glands in males of the phlebotomine sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Annals of tropical medicine and parasitology* 84, 53-61. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/00034983.1990.11812433>

Law, J. H., and F. E. Regnier, 1971. Pheromones. 40, 533-548.

Lehane, M. J., 1991. Feeding preferences of blood-sucking insects, pp. 14-24, In *Biology of Blood-Sucking Insects*. Springer. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-94-011-7953-9_3

Lindh, J. M., A. Kannaste, B. G. Knols, I. Faye, and A. K. Borg-Karlson, 2008. Oviposition responses of *Anopheles gambiae* s.s. (Diptera: Culicidae) and identification of volatiles from bacteria-containing solutions. *J. Med. Entomol.* 45, 1039-1049. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jmedent/45.6.1039>

Lyimo, I. N., and H. M. Ferguson, 2009. Ecological and evolutionary determinants of host species choice in mosquito vectors. *Trends Parasitol* 25, 189-196. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pt.2009.01.005>

Macedo-Silva, V. P., D. R. A. Martins, P. V. S. De Queiroz, M. P. G. Pinheiro, C. C. M. Freire, J. W. Queiroz, K. M. Dupnik, R. D. Pearson, M. E. Wilson, S. M. B. Jeronimo, and M. D. F. F. M. Ximenes, 2014. Feeding preferences of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae), the sand fly vector, for *Leishmania infantum* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). *J. Med. Entomol.* 51, 237-244.

Machado, V. E., A. G. Corrêa, T. M. Goulart, F. B. d. R. Silva, D. G. S. Ortiz, and M. C. Pinto, 2015. Attraction of the sand fly *Nyssomyia neivai* (Diptera: Psychodidae) to chemical compounds in a wind tunnel. *Parasit Vectors.* 8, 147-150. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0748-y>

Magalhães-Junior, J. T., S. M. Barrouin-Melo, A. G. Corrêa, F. B. da Rocha Silva, V. E. Machado, J. S. Govone, and M. C. Pinto, 2014. A laboratory evaluation of alcohols as attractants for the sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera:Psychodidae). Parasit Vectors. 7, 60. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-60>

Magalhães-Junior, J. T., A. d. A. Oliva-Filho, H. O. Novais, P. R. R. Mesquita, F. M. Rodrigues, M. C. Pinto, and S. M. Barrouin-Melo, 2019. Attraction of the sandfly *Lutzomyia longipalpis* to possible biomarker compounds from dogs infected with *Leishmania infantum*. Med Vet Entomol. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/mve.12357>

Magnarelli, L. A., G. B. Modi, and R. B. Tesh, 1984. Follicular Development and Parity in Phlebotomine Sand Flies (Diptera: Psychodidae). J. Med. Entomol. 21, 681-689. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jmedent/21.6.681>

Mangabeira, F. O., 1969. On the systematics and biology of the *Phlebotomus* of Ceará. Rev. bras. malariol. doenças trop. 21, 4-25.

Mann, R.S., Kaufman, P.E., Butler, J.F., 2009. *Lutzomyia spp.* (Diptera: Psychodidae) Response to Olfactory Attractant- and Light Emitting Diode-Modified Mosquito Magnet X (MM-X) Traps. J. Med. Entomol. 46, 1052-1061. Disponível em: <https://doi.org/10.1603/033.046.0512>

Mann, R. S., and P. E. Kaufman, 2010. Colonization of *Lutzomyia shannoni* (Diptera: Psychodidae) utilizing an artificial blood feeding technique. J. Vector Ecol. 35, 286-294. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1948-7134.2010.00084.x>

Marayati, B. F., C. Schal, L. Ponnusamy, C. S. Apperson, T. E. Rowland, and G. Wasserberg, 2015. Attraction and oviposition preferences of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae), vector of Old-World cutaneous leishmaniasis, to larval rearing media. Parasit Vectors. 8, 663. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1261-z>

Margonari, C. S., C. L. Fortes-dias, and E. S. Dias, 2004. Genetic Variability in Geographical Populations of *Lutzomyia whitmani* Elucidated by RAPD-PCR. J Med. Entomol. 41, 187-192. Disponível em: <https://doi.org/10.1603/0022-2585-41.2.187>

Maroli, M., E. Guandalini, and S. Fiorentino, 1987. Biology of a Laboratory Colony of *Phlebotomus perniciosus* (Diptera: Psychodidae). J. Med. Entomol. 24, 547-551. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jmedent/24.5.547>

Mauer, D. J., and W. A. Rowley, 1999. Attraction of *Culex pipiens pipiens* (Diptera: Culicidae) to flower volatiles. J. Med. Entomol. 36, 503-507. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jmedent/36.4.503>

May-Concha, I., J. C. Rojas, L. Cruz-López, J. G. Millar, and J. M. Ramsey, 2012. Volatile compounds emitted by *Triatoma dimidiata*, a vector of Chagas disease: chemical analysis and behavioural evaluation. Med. Vet. Entomol. 27, 165-174. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2012.01056.x>

- May-Concha, I. J., L. C. Cruz-López, J. C. Rojas, and J. M. Ramsey, 2018. “Sweeter than a rose”, at least to *Triatoma phyllosoma* complex males (Triatominae: Reduviidae). *Parasit Vectors* 11, 95. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2677-z>
- Milleron, R. S., C. R. Meneses, D. A. Elnaïem, and G. C. Lanzaro, 2008. Effects of Varying Moisture on Egg Production and Longevity of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *J. Med. Entomol.* 45, 160-165. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jmedent/45.1.160>
- Ministério da Saúde, 2017a. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar, pp. 189. Ministério da Saúde, Brasília. Disponível em: http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar.pdf
- Ministério da Saúde, 2017b. Guia de Vigilância em Saúde, pp. 189. Ministério da Saúde, Brasília. Disponível em: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/outubro/06/Volume-Unico-2017.pdf>
- Montoya-Lerma, J., 1992. Autogeny in the neotropical sand fly *Lutzomyia lichyi* (Diptera: Psychodidae) from Colombia. *J. Med. Entomol.* 29, 698-699. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jmedent/29.4.698>
- Montoya-Lerma, J., and R. P. Lane, 1996. Factors affecting host preference of *Lutzomyia evansi* (Diptera: Psychodidae), a vector of visceral leishmaniasis in Colombia. *Bull. Entomol. Res.* 86, 43-50. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S0007485300052184>
- Moore, J. S., T. B. Kelly, R. Killick-Kendrick, M. Killick-Kendrick, K. R. Wallbanks, and D. H. Molyneux, 1987. Honeydew sugars in wild-caught *Phlebotomus ariasi* detected by high performance Liquid Chromatography (HPLC) and Gas Chromatography (GC). *Med. Vet. Entomol.* 1, 427-434. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.1987.tb00373.x>
- Morton, I. E., and R. D. Ward, 1989a. Laboratory response of female *Lutzomyia longipalpis* sandflies to a host and male pheromone source over distance. *Med. Vet. Entomol.* 3, 219-223. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.1989.tb00218.x>
- Morton, I. E., and R. D. Ward, 1989b. A new pheromone bioassay for the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 83, 429. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/0035-9203\(89\)90528-2](http://dx.doi.org/10.1016/0035-9203(89)90528-2)
- Mota, T., A. C. R. Vitta, A. N. Lorenzo-Figueiras, C. P. Barezani, C. L. Zani, C. R. Lazzari, L. Diotaiuti, L. Jeffares, B. Bohman, and M. G. Lorenzo, 2014. A Multi-species Bait for Chagas Disease Vectors. *PLoS Negl Trop Dis.* 8, e2677. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002677>
- Müller, G. C., E. E. Revay, and Y. Schlein, 2011. Relative attraction of the sand fly *Phlebotomus papatasi* to local flowering plants in the Dead Sea region. *J. Vector Ecol.* 36, S187-S194. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1948-7134.2011.00130.x>
- Muniz, L. H. G., R. M. Rossi, H. C. Neitzke, W. M. Monteiro, and U. Teodoro, 2006. Estudo dos hábitos alimentares de flebotomíneos em área rural no sul do Brasil. *Rev. Saúde Públ.* 40, 1087-1093. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-89102006000700018>

Muto, S.-e., Y. Nishimura, and K. Mori, 1999. Synthesis of Germacrene-B and Its Extension to the Synthesis of (\pm)-9-Methylgermacrene-B, the Racemate of the Male-Produced Sex Pheromone of the Sandfly *Lutzomyia longipalpis* from Lapinha, Brazil. Eur. J. Org. Chem. 1999, 2159-2165. Disponível em: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-0690\(199909\)1999:9<2159::AID-EJOC2159>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-0690(199909)1999:9<2159::AID-EJOC2159>3.0.CO;2-B)

Nevatte, T. M., R. D. Ward, L. Sedda, and J. G. C. Hamilton, 2017. After infection with *Leishmania infantum*, Golden Hamsters (*Mesocricetus auratus*) become more attractive to female sand flies (*Lutzomyia longipalpis*). Sci. Rep. 7, 6104-6104. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06313-w>

Nicolas, G., Sillans, D., 1989. Immediate and Latent Effects of Carbon Dioxide on Insects. Ann. Rev. Entomol. 34, 97-116. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev.en.34.010189.000525>

Nieves, E., A. Ribeiro, and R. Brazil, 1997. Physical factors influencing the oviposition of *Lutzomyia migonei* (Diptera: Psychodidae) in laboratory conditions. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 92, 733-737. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02761997000600002>

Nigam, Y., and R. D. Ward, 1991. The effect of male sandfly pheromone and host factors as attractants for female *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). Physiol. Entomol. 16, 305-312. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3032.1991.tb00569.x>

Noguera, P., M. Rondon, and E. Nieves, 2006. Effect of blood source on the survival and fecundity of the sandfly *Lutzomyia ovallesi* Ortiz (Diptera: Psychodidae), vector of *Leishmania*. Biomedica : Revista del Instituto Nacional de Salud 26(1), 57-63.

Nordlund, D.A., Lewis, W.J., 1976. Terminology of chemical releasing stimuli in intraspecific and interspecific interactions. J. Chem. Ecol. 2, 211-220. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF00987744>

Oksanen, J., Blanchet, F.G., Kindt, R., Legendre, P., McGlinn, D., Minchin, P.R., O'Hara, R.B., Simpson, G.L., Solymos, P., Henry, M., Stevens, H., Szoecs, E., Wagner, H., 2018. Vegan: community ecology package. R package vegan, vers. 2.5-2. Disponível em: <https://cran.r-project.org/web/packages/vegan/index.html>

Oliveira, E. F., W. S. Fernandes, E. T. Oshiro, A. G. Oliveira, and E. A. Galati, 2015. Alternative Method for the Mass Rearing of *Lutzomyia (Lutzomyia) cruzi* (Diptera: Psychodidae) in a Laboratory Setting. J Med Entomol 52, 925-931. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jme/tjv102>

Oliveira, E. F., A. E. Casaril, W. S. Fernandes, M. d. S. Ravanelli, M. J. d. Medeiros, R. M. Gamarra, A. C. Paranhos Filho, E. T. Oshiro, A. G. d. Oliveira, and E. A. B. Galati, 2016. Monthly Distribution of Phlebotomine Sand Flies, and Biotic and Abiotic Factors Related to Their Abundance, in an Urban Area to Which Visceral Leishmaniasis Is Endemic in Corumbá, Brazil. PLOS ONE 11, e0165155. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165155>

O'Shea, B., E. Rebollar-Tellez, R. D. Ward, J. G. Hamilton, D. el Naiem, and A. Polwart, 2002. Enhanced sandfly attraction to *Leishmania*-infected hosts. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 96, 117-118. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0035-9203\(02\)90273-7](https://doi.org/10.1016/S0035-9203(02)90273-7)

Ortiz, D.G.S., Pinto, M.C., Cesario, M., Galati, E.A.B., Molina, S.M.G., Borges, D.A., 2018. Three new records of the genus *Lutzomyia* of the subgenus *Helcocyrtomyia* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) from Southwestern Brazilian Amazonia. *Acta Trop.* In Press. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.09.005>

OPAS (Organização Panamericana da Saúde), 2018. Leishmanioses: Informe Epidemiológico nas Américas. Organização Panamericana da Saúde, Washington. Disponível em: <http://iris.paho.org/xmlui/handle/123456789/34857>. Acessado em: Julho 2018.

Palsson, K., T. G. Jaenson, P. Baeckstrom, and A. K. Borg-Karlson, 2008. Tick repellent substances in the essential oil of *Tanacetum vulgare*. *J Med Entomol* 45, 88-93. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jmedent/45.1.88>

Pawliszyn, J., 2012. Theory of solid-phase microextraction. In: *Handbook of solid phase microextraction*. Elsevier, pp. 13-59.

Pearson, R. D., and A. Q. Sousa, 1996. Clinical spectrum of Leishmaniasis. *Clin Infect Dis.* 22(1), 1-13. <https://doi.org/10.1093/clinids/22.1.1>

Peterkova-Koci, K., M. Robles-Murguia, M. Ramalho-Ortigao, and L. Zurek, 2012. Significance of bacteria in oviposition and larval development of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Parasit Vectors* 5, 145-145. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-145>

Pherobase (The Pherobase, Database of pheromones and semiochemicals), 2018. Disponível em: <http://www.pherobase.com/>, (acesso em: Jun. 2018).

Phillips, A., R. Ward, L. Ryan, D. H. Molyneux, R. Lainson, and J. J. Shaw, 1986. Chemical analysis of compounds extracted from the tergal "spots" of *Lutzomyia longipalpis* from Brazil. *Acta Trop* 43, 271-276.

Pinto, M.C., Campbell-Lendrum, D.H., Lozovei, A.L., Teodoro, U., Davies, C.R., 2001. Phlebotomine sandfly responses to carbon dioxide and human odour in the field. *Med Vet Entomol.* 15, 132-139. Disponível em: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2915.2001.00294.x>

Pinto, M.C., Barbieri, K., Silva, M.C.E., Graminha, M.A.S., Casanova, C., Andrade, A.J., Eiras, A.E., 2011. Octenol as Attractant to *Nyssomyia neivai* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in the Field. *J. Med. Entomol.* 48, 39-44. Disponível em: <https://doi.org/10.1603/ME10081>

Pinto, M.C., Bray, D.P., Eiras, A.E., Carvalheira, H.P., Puertas, C.P., 2012. Attraction of the cutaneous leishmaniasis vector *Nyssomyia neivai* (Diptera: Psychodidae) to host odour components in a wind tunnel. *Parasit. Vectors.* 5, 210. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-210>

Pita-Pereira, D.d., Alves, C.R., Souza, M.B., Brazil, R.P., Bertho, Á.L., Barbosa, A.d.F., Britto, C.C., 2005. Identification of naturally infected *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia migonei* with *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Rio de Janeiro (Brazil) revealed by a PCR multiplex non-isotopic hybridisation assay. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 99, 905-913. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2005.06.019>

Pontes, G. B., B. Bohman, C. R. Unelius, and M. G. Lorenzo, 2008. Metasternal Gland Volatiles and Sexual Communication in the Triatomine Bug, *Rhodnius prolixus*. J. Chem. Ecol. 34, 450-457. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10886-008-9431-5>

Pugedo, H., Barata, R.A., França-Silva, J.C., Silva, J.C., Dias, E.S., 2005. HP: um modelo aprimorado de armadilha luminosa de sucção para a captura de pequenos insetos. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 38, 70-72. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822005000100017>

Quinnell, R. J., C. Dye, and J. J. Shaw, 1992. Host preferences of the phlebotomine sandfly *Lutzomyia longipalpis* in Amazonian Brazil. Med.Vet. Entomol. 6, 195-200. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.1992.tb00606.x>

Quinnell, R. J., and C. Dye, 1994a. An experimental study of the peridomestic distribution of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). Bull. Entomol. Res. 84, 379-382. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S0007485300032508>

Quinnell, R. J., and C. Dye, 1994b. Correlates of the peridomestic abundance of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in Amazonian Brazil. Med. Vet. Entomol. 8, 219-224. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.1994.tb00502.x>

R Core Team, 2018. R: A language and environment for statistical computing, version R-3.5.1. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. 2018. Disponível em: <http://www.R-project.org>

Rangel, E. F., N. A. Souza, E. D. Wermelinger, A. F. Barbosa, and C. A. Andrade, 1986. Biologia de *Lutzomyia intermedia* Lutz & Neiva, 1912 e *Lutzomyia longipalpis* Lutz & Neiva, 1912 (Diptera, Phychodidae), em condições experimentais. I. aspectos da alimentação de larvas e adultos. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 81, 431-438. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02761986000400010>

Rangel, E. F., and M. L. Vilela, 2008. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. Cad. Saúde Pública 24, 2948-2952. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-311X2008001200025>

Rangel EF, Lainson R., 2009. Proven and putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 104, 937-954. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762009000700001>

Rangel E.F., Costa S.M., Carvalho B.M., 2014. Environmental changes and the geographic spreading of American cutaneous leishmaniasis in Brazil. In: Claborn, D. (ed) Leishmaniasis - Trends in epidemiology, diagnosis and treatment. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5772/57207>

Rangel, E. F., and J. J. Shaw, 2018. Brazilian Sand flies Biology, Taxonomy, Medical Importance and Control. Springer. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-3-319-75544-1>

Rangel, E. F., Lainson, R., Carvalho, B. M., Costa, S. M. and Shaw J. J., 2018. Sand Fly Vectors of American Cutaneous Leishmaniasis, in: Rangel, E.F., Shaw, J.J., (Eds.), Brazilian Sand flies Biology, Taxonomy, Medical Importance and Control, Springer.pp. 341–380. in Brazil 2018.

Ready, P. D., 1979. Factors affecting egg production of laboratory-bred *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). J. Med. Entomol. 16, 413-423. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jmedent/16.5.413>

Ready, P. D., J. C. Day, A. A. de Souza, E. F. Rangel, and C. R. Davies, 1997. Mitochondrial DNA characterization of populations of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) incriminated in the peri-domestic and silvatic transmission of *Leishmania* species in Brazil. Bull. Entomol. Res. 87, 187-195. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S0007485300027346>

Ready, P. D., A. A. de Souza, J. M. M. Rebelo, J. C. Day, F. T. Silveira, D. Campbell-Lendrum, C. R. Davies, and J. M. L. Costa, 1998. Phylogenetic species and domesticity of *Lutzomyia whitmani* at the south-east boundary of Amazonian Brazil. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 92, 159-160. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0035-9203\(98\)90726-X](https://doi.org/10.1016/S0035-9203(98)90726-X)

Ready, P.D., 2011. Should sand fly taxonomy predict vectorial and ecological traits? J. Vec. Ecol. 36(1), S17-22. Disponível em: <http://www.bioone.org/doi/full/10.1111/j.1948-7134.2011.00108.x>

Ready, P.D., 2013. Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. Annu. Rev. Entomol. 58, 227-250. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120811-153557>

Rebêlo, J. M., 1999. Flebótomos vetores das leishmanioses (Manual para técnicos e profissionais de Saúde). Ministério da Saúde, Universidade Federal do Maranhão, São Luis, Maranhão, Brazil.

Rebollar-Tellez, E. A., J. G. C. Hamilton, and R. D. Ward, 1999. Response of female *Lutzomyia longipalpis* to host odour kairomones from human skin. Physiol Entomol. 24, 220-226. Disponível em: <https://doi.org/10.1046/j.1365-3032.1999.00133.x>

Reinhard, J., 2004. Insect chemical communication, Chemosense. 6. Disponível em: <http://www.inscent.com/docs/chemosept04v5.pdf>

Ribeiro, L. M., E. T. Oshiro, D. A. d. Souza, M. F. Fernandes, K. M. d. Santos, N. L. F. Mateus, and A. G. d. Oliveira, 2015. Biological aspects of immature stage of *Nyssomyia whitmani* (Antunes and Coutinho) (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) in laboratory conditions. Rev. Bras. Entomol. 59, 100-103. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rbe.2015.02.012>

Rutledge, L. C., and H. L. Mosser, 1972. Biology of immature sandflies (Diptera: Psychodidae) at the bases of trees in Panama. *Environ Entomol.* 1, 300-309.

Sant'Ana, A. L., A. E. Eiras, and R. R. Cavalcante, 2002. Electroantennographic responses of the *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Lutz & Neiva) (Diptera: Psychodidae) to 1-octen-3-ol. *Neotrop. Entomol.* 31, 13-17. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S1519-566X2002000100002>

Santos, S. O., J. Arias, A. A. Ribeiro, M. Paiva Hoffmann, R. A. Freitas, and M. A. Malacco, 1998. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American visceral leishmaniasis. *Med Vet Entomol* 12, 315-317. Disponível em: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2915.1998.00104.x>

Serrano, A. K., J. C. Rojas, L. C. Cruz-López, E. A. Malo, O. F. Mikery, and A. Castillo, 2016. Presence of Putative Male-Produced Sex Pheromone in *Lutzomyia cruciata* (Diptera: Psychodidae), Vector of *Leishmania mexicana*. *J. Med. Entomol.* 53, 1261-1267. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jme/tjw118>

Shimabukuro, P. H., T. R. da Silva, F. O. Ribeiro, L. A. Baton, and E. A. Galati, 2010. Geographical distribution of American cutaneous leishmaniasis and its phlebotomine vectors (Diptera: Psychodidae) in the state of Sao Paulo, Brazil. *Parasit Vectors.* 3, 121. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1756-3305-3-121>

Shimabukuro, P. H. F., A. J. de Andrade, and E. A. B. Galati, 2017. Checklist of American sand flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae): genera, species, and their distribution. *ZooKeys* 660, 67-106. Disponível em: <https://doi.org/10.3897/zookeys.660.10508>

Shuqin, L., and O. Gangfeng, 2017. Introduction of Solid-Phase Microextraction, Solid Phase Microextraction: Recent Developments and Applications, Springer, Germany. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-3-662-53598-1>

Silveira, F.T., Ishikawa, E.A.Y., De Souza, A.A.A., Lainson, R., 2002. An outbreak of cutaneous leishmaniasis among soldiers in Belém, Pará State, Brazil, caused by *Leishmania (Viannia) lindenbergi* n. sp. *Parasite* (Paris, France) 9, 43-50. Disponível em: <https://doi.org/10.1051/parasite/200209143>

Smallegange, R.C., Takken, W., 2010. Host-seeking behaviour of mosquitoes: responses to olfactory stimuli in the laboratory, in: Takken, W., Knols, G.J. (Eds.), *Olfaction in Vector-host Interactions*. Wageningen Academic Publishers, Wageningen.

Smallegange, R.C., Qiu, Y.T., Bukovinszkiné-Kiss, G., Van Loon, J.J.A., Takken, W., 2009. The effect of aliphatic carboxylic acids on olfaction-based host-seeking of the malaria mosquito *Anopheles gambiae sensu stricto*. *J. Chem. Ecol.* 35(2009), 933-943. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s10886-009-9668-7>

Souza, N. A., C. A. Andrade-Coelho, M. L. Vilela, A. F. Barbosa, and E. F. Rangel, 1999. A new larval diet for colonization of Phlebotominae sand flies. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94, 845-847. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02761999000600025>

Souza, N.A., Andrade-Coelho, C.A., Vilela, M.L., Peixoto, A.A., Rangel, E.F., 2002. Seasonality of *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae:

Phlebotominae), occurring sympatrically in area of cutaneous leishmaniasis in the State of Rio de Janeiro, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 97, 759-765. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762002000600001>

Spiegel, C. N., D. B. Dias, A. S. Araki, J. G. Hamilton, R. P. Brazil, and T. M. Jones, 2016. The *Lutzomyia longipalpis* complex: a brief natural history of aggregation-sex pheromone communication. Parasit Vectors. 9, 580. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1866-x>

Spiegel, C. N., P. Jeanbourquin, P. M. Guerin, A. M. Hooper, S. Claude, R. Tabacchi, S. Sano, and K. Mori, 2005. (1S,3S,7R)-3-methyl-alpha-himachalene from the male sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) induces neurophysiological responses and attracts both males and females. J. Insect. Physiol 51, 1366-1375. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2005.08.007>

Spiegel, C. N., R. P. Brazil, and M. J. Soares, 2002. Ultrastructure of male sex pheromone glands in abdominal tergites of five *Lutzomyia* sandfly species (Diptera: Psychodidae). Arthropod Structure & Development 30, 219-227. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1467-8039\(01\)00033-0](https://doi.org/10.1016/S1467-8039(01)00033-0)

Steverding, D., 2017. The history of leishmaniasis. Parasit Vectors. 10, 82. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2028-5>

SUCEN (Superintendência de Controle de Endemias), 2018. Disponível em: <http://www.saude.sp.gov.br/sucen-superintendencia-de-controle-de-endemias/> (acesso em: Apr. 2018).

Supelco, 2017. Solid Phase Microextraction: Theory and Optimization of Conditions: Bulletin 923. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4600/4547.pdf> (acesso em: 01 Jun, 2017).

(SVS) Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, 2017. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Secretaria de Vigilância em Saúde, Brasília. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar.pdf (acesso em: 10 September 2018)

Syed, Z., and W. S. Leal, 2009. Acute olfactory response of *Culex* mosquitoes to a human- and bird-derived attractant. PNAS 106(44), 18803-18808. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.0906932106>

Tabares, M., M. Ortiz, M. Gonzalez, C. Carazzone, M. J. Vives Florez, and J. Molina, 2018. Behavioral responses of *Rhodnius prolixus* to volatile organic compounds released in vitro by bacteria isolated from human facial skin. PLoS Negl. Trop. Dis. 12, e0006423. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006423>

Tavares, D.d.S., Salgado, V.R., Miranda, J.C., Mesquita, P.R.R., Rodrigues, F.d.M., Barral-Netto, M., de Andrade, J.B., Barral, A., 2018. Attraction of phlebotomine sandflies to volatiles from skin odors of individuals residing in an endemic area of tegumentary leishmaniasis. Plos one 13(9), e0203989. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203989>

Telang, A., Y. Li, F. G. Noriega, and M. R. Brown, 2006. Effects of larval nutrition on the endocrinology of mosquito egg development. *J. Exp. Biol.* 209, 645-655. Disponível em: <https://doi.org/10.1242/jeb.02026>

Teles, C.B., Santos, A.P., Freitas, R.A., Oliveira, A.F., Ogawa, G.M., Rodrigues, M.S., Pessoa, F.A., Medeiros, J.F., Camargo, L.M., 2016. Phlebotomine sandfly (Diptera: Psychodidae) diversity and their *Leishmania* DNA in a hot spot of American Cutaneous Leishmaniasis human cases along the Brazilian border with Peru and Bolivia. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 111, 423-432. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/0074-02760160054>

Travi, B. L., C. Jaramillo, J. Montoya, I. Segura, A. Zea, A. Goncalves, and I. D. Velez, 1994. *Didelphis marsupialis*, an important reservoir of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* in Colombia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 50, 557-565. Disponível em: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1994.50.557>

Valdivia, H.O., De Los Santos, M.B., Fernandez, R., Baldeviano, G.C., Zorrilla, V.O., Vera, H., Lucas, C.M., Edgel, K.A., Lescano, A.G., Mundal, K.D., Graf, P.C., 2012. Natural *Leishmania* infection of *Lutzomyia auraensis* in Madre de Dios, Peru, detected by a fluorescence resonance energy transfer-based real-time polymerase chain reaction. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 87, 511-517. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.4269%2Fajtmh.2012.11-0708>

Venter, G. J., S. N. B. Boikanyo, and C. J. de Beer, 2019. The influence of temperature and humidity on the flight activity of *Culicoides imicola* both under laboratory and field conditions. *Parasit Vectors* 12, 4. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3272-z>

Ward, R. D., A. L. Ribeiro, P. D. Ready, and A. Murtagh, 1983. Reproductive isolation between different forms of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva), (Diptera: Psychodidae), the vector of *Leishmania donovani chagasi* Cunha & Chagas and its significance to kala-azar distribution in South America. *Mem.Inst. Oswaldo Cruz* 78, 269-280. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02761983000300005>.

Ward, R. D., I. Morton, V. Lancaster, P. Smith, and A. Swift, 1989. Bioassays as an Indicator of Pheromone Communication in *Lutzomyia Longipalpis* (Diptera: Psychodidae), pp. 235-243. In D. T. Hart (ed.), *Leishmaniasis: The Current Status and New Strategies for Control*. Springer US, Boston, MA. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-1-4613-1575-9_29

Ward, R. D., J. G. Hamilton, M. Dougherty, and A. L. Falcao, 1991. Pheromones in Old and New World sandflies (Diptera: Psychodidae). *Ann Trop Med Parasitol.* 85, 667-668. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/00034983.1991.11812624>

Ward, R. D., J. G. C. Hamilton, M. Dougherty, A. L. Falcao, M. D. Feliciangeli, J. E. Perez, and C. J. Veltkamp, 1993. Pheromone disseminating structures in tergites of male phlebotomines (Diptera: Psychodidae). *Bull. Entomol. Res.* 83, 437-445. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S0007485300029357>

Wasserberg, G., and E. D. Rowton, 2011. Sub-additive effect of conspecific eggs and frass on oviposition rate of *Lutzomyia longipalpis* and *Phlebotomus papatasi*. *J. Vector Ecol.* 36, Supplement 1. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1948-7134.2011.00123.x>

Whittaker, R. H., and P. P. Feeny, 1971. Allelochemicals: Chemical Interactions between Species. *Science* 26 (171), 757-770. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.171.3973.757>

WHO (World health organization), 2018. Leishmaniasis. Key facts. Accessed May 10, 2018. Disponível em: <http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>

Wilkes, T. J., P. D. Ready, R. Lainson, and R. Killick-Kendrick, 1984. Biting periodicities of nulliparous and parous females of *Psychodopygus wellcomei*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 78, 846-847. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(84\)90044-0](https://doi.org/10.1016/0035-9203(84)90044-0)

Yu, B. T., Y. M. Ding, Y. Hu, J. X. Tian, X. G. Song, Z. G. Li, and J. C. Mo, 2018. Attraction of *Culex pipiens pallens* (Diptera: Culicidae) to Floret Volatiles and Synthetic Blends of Its Nectar Host Plant *Abelia chinensis* (Rubiales: Caprifoliaceae). *J Med. Entomol.* 56, 29-34. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jme/tjy161>

Young, D. G., and M. A. Duncan, 1994. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). Walter Reed Army Inst of Research Washington dc. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(95\)90687-8](https://doi.org/10.1016/0035-9203(95)90687-8)

Zahradnickova, H., and E. A. Bouman, 2006. Optimization of the solid-phase microextraction method in the determination of *Ixodes ricinus* (L.) volatiles. *J. Sep. Sci.* 29, 236-241. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jssc.200500282>

Zhang, Z., M. J. Yang, and J. Pawliszyn, 1994. Solid-Phase Microextraction. A Solvent-Free Alternative for Sample Preparation. *Anal. Chem.*, 66(17), 844A-853A. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ac00089a001>

APÊNDICE

Apêndice 1.1 Códigos no programa estatístico R, para verificar o ordenamento das espécies de flebotomíneos capturados com três tipos de armadilhas: Luz, Bg-Lure+Luz e Bg-Sweetscent+Luz.

```
summary(dados)
doriginal<- read.csv("dados.csv",h=T,sep=";", dec=",")
# Usando apenas 3 primeiras Noites de P1
doriginal123<- doriginal[doriginal$local<4,]
doriginal4<- doriginal[doriginal$local==4&doriginal$noite<=3,]
doriginalr<- rbind(doriginal123,doriginal4)
soma<- apply(doriginalr[, -c(1:7)], 2, sum)
porc<- 100*soma/sum(soma)
soma1<- apply(doriginalr[doriginalr$ambiente=="matal", -c(1:7)], 2, sum)
porc1<- 100*soma1/sum(soma1)
soma2<- apply(doriginalr[doriginalr$ambiente=="mata2", -c(1:7)], 2, sum)
porc2<- 100*soma2/sum(soma2)
soma3<- apply(doriginalr[doriginalr$ambiente=="mata3", -c(1:7)], 2, sum)
porc3<- 100*soma3/sum(soma3)
soma4<- apply(doriginalr[doriginalr$ambiente=="Peri", -c(1:7)], 2, sum)
porc4<- 100*soma4/sum(soma4)

# Imprimir porcentagens das espécies
sel<- cbind(porc1,porc2,porc3,porc4,porc)
# Espécies selecionadas com pelo menos 1% em algum local
selesp<- sel[apply(sel,1,max)>=1,]
esp<- rownames(selesp)
# Removendo as espécies raras 1% ou menos
dadosesp<- doriginalr[,esp]
# Juntando com as informações local, atrativo e sexo
dadosesp<- cbind(doriginalr[,1:7],dadosesp)
# Somando abundancias das 3 noites
a<- aggregate(dadosesp[, -c(1:7)], list(dadosesp$sexo,dadosesp$local,dadosesp$atrativo), sum)
a <- a[order(a$Group.2,a$Group.3,a$Group.1),]
# Renomeando para os gráficos
a$local <- rep(c("F1","F2","F3","P1"), rep(6,4))
a$atrativo <- rep(rep(c("LL","BGL","BGS"), rep(2,3)), 4)
a$sexo <- rep(c("M","F"), 12)
```

```

a
dim(a)
aesp<- a[,-c(1:3,22:24)]
aenv<- a[,22:24]
library(vegan)
# Modelo completo

full.cca <- cca(aesp~aenv$local+aenv$atrativo+aenv$sexo+aenv$local:aenv$sexo+aenv$atrativo:aenv$sexo)
summary(full.cca)

# Teste de interação atrativo x sexo

intatrativosexo.cca <- cca(aesp~aenv$local+aenv$atrativo+aenv$sexo+aenv$local:aenv$sexo)
anova.cca(full.cca,intatrativosexo.cca)

# A comparação acima indica que a interação atrativo:sexo não é significativa (valor-p=0.606)

# Teste de interação local vs sexo

intllocalsexo.cca <- cca(aesp~aenv$local+aenv$atrativo+aenv$sexo+aenv$atrativo:aenv$sexo)
anova.cca(full.cca,intllocalsexo.cca)

# A comparação acima indica que a interação local:sexo é significativa (valor-p=0.001)

# Teste de efeito principal atrativo

intatrativo.cca <- cca(aesp~aenv$local+aenv$sexo+aenv$local:aenv$sexo)
anova.cca(intatrativosexo.cca,intatrativo.cca)

# A comparação acima indica que o efeito de atrativo é significativo (valor-p=0.041). # Assim nosso modelo final é:

final.cca <- cca(aesp~aenv$local+aenv$atrativo+aenv$sexo+aenv$local:aenv$sexo)
summary(final.cca)

# Esse modelo indica que a proporção da inércia do modelo restrito (explicado pelos efeitos acima)
# é de 0.8316 da inércia total nos dados.

x11()

ordiplot(final.cca,type="n",xlab="CCA1",ylab="CCA2")
orditorp(final.cca,display="sites",col=1,air=0.01,labels=aenv$local,cex=.6)
orditorp(final.cca,display="species",col=2,air=0.01)

#ordispider(final.cca,groups=aenv$local,col=4:1,label=T,cex=.6)

ordihull(final.cca,groups=aenv$atrativo,col=c("orange","blue","green"),
border=(col=c("orange","blue","green")),draw="polygon",alpha=50,label=F,lwd=1,5)
orditorp(final.cca,display="species",col=2,air=0.01)

ordispider(final.cca,groups=aenv$atrativo,col=c("orange","blue","green"),label=T,cex=.6,lwd=1,5)

x11()

```

```

aenv$LS <- c("F1M", "F1F", "F1M", "F1F", "F1M", "F1F", "F2M", "F2F", "F2M", "F2F", "F2M", "F2F",
"F3M", "F3F", "F3M", "F3F", "F3M", "F3F", "P1M", "P1F", "P1M", "P1F", "P1M", "P1F")

ordiplot(final.cca, type="n", xlab="CCA1", ylab="CCA2")

orditorp(final.cca, display="species", col=2, air=0.01)

orditorp(final.cca, display="sites", col=1, air=0.01, labels="o")

ordiellipse(final.cca, groups=aenv$LS, col=c("orange", "blue", "red", "yellow", "purple",
"pink", "green", "cyan"), kind="sd", conf=.95, draw="polygon", alpha=100, cex=.8, label=F,
border=(col="black"))

orditorp(final.cca, display="species", col=2, air=0.01)

ordispider(final.cca, groups=aenv$LS, col="black", label=T, cex=.5, lwd=.7)

```

Apêndice 1.2. Comandos no programa R utilizados para o ajuste do modelo linear generalizado misto para *Pi. nevesi*, *Ny. whitmani* e *Ny. antunesi*, espécies com maior abundância durante o período de coleta.

```
summary(dados)

# instalar pacotes: lme4, ggplot2, optimx, blme4
doriginal<- read.csv("dados.csv",h=T,sep=";", dec=",")

# arrumar para doriginal
names(doriginal)
doriginal$local <- factor(doriginal$local)
doriginal$noite <- factor(doriginal$noite)
doriginal$sexo <- factor(doriginal$sexo)
doriginal$atrativo <- factor(doriginal$atrativo)
doriginal$ponto <- factor(doriginal$ponto)
with(doriginal,table(local,noite,ambiente))

legendax<- c("F1LL","F1BGL","F1BGS","F2LL","F2BGL","F2BGS","F3LL","F3BGL","F3BGS","
P1LL","P1BGL","P1BGS")

#,"F1LL","F1BGL","F1BGS","F2LL","F2BGL","F2BGS","F3LL","F3BGL","F3BGS","P1LL","P1BGL",
"P1BGS")

# Analise para Pi. nevesi

x11()
par(mfrow=c(2,1),mar = c(2, 4, 1, 1) + 0.1)
with(doriginal[doriginal$sexo==1,],boxplot(P.nev~atrativo*local,ylab=expression(italic("Pi. nevesi"))~abundance),
pars=list(boxwex=0.3),names=legendax,las=1,cex.axis = 0.6,border=1)) mtext(side=2,line=2,at=15,"(Male)",cex=.8)
with(doriginal[doriginal$sexo==2,],boxplot(P.nev~atrativo*local,ylab=expression(italic("Pi. nevesi"))~abundance),
pars=list(boxwex=0.3),names=legendax,las=1,cex.axis = 0.6,border=1)) mtext(side=2,line=2,at=40,"(Female)",cex=.8)
par(mfrow=c(2,1),mar = c(2, 4, 1, 1) + 0.1)
with(doriginal[doriginal$sexo==1,],boxplot(log(P.nev+1)~atrativo*local,ylab=expression(Log(italic("Pi. nevesi"))~abundance),
pars=list(boxwex=0.3),names=legendax,las=1,cex.axis = 0.6,border=1))
mtext(side=2,line=2,at=15,"(Male)",cex=.8)
with(doriginal[doriginal$sexo==2,],boxplot(log(P.nev+1)~atrativo*local,ylab=expression(Log(italic("Pi. nevesi"))~abundance),
pars=list(boxwex=0.3),names=legendax,las=1,cex.axis = 0.6,border=1))
mtext(side=2,line=2,at=2,"(Female)",cex=.8)

# Analise para Pi. nevesi

# Medias observadas originais
tapply(doriginal$P.nev,list(doriginal$sexo,doriginal$atrativo,doriginal$local),mean)

# Desvio padrão
```

```

tapply(doriginal$P.nev,list(doriginal$sexo,doriginal$atrativo,doriginal$local),sd)

# Medias observadas na escala log
tapply(log(doriginal$P.nev+1),list(doriginal$sexo,doriginal$atrativo,doriginal$local),mean)

# Desvio padrão
tapply(log(doriginal$P.nev+1),list(doriginal$sexo,doriginal$atrativo,doriginal$local),sd)

# Medias observadas geométricas
exp(tapply(log(doriginal$P.nev+1),list(doriginal$sexo,doriginal$atrativo,doriginal$local),mean))

# Desvio padrão
sqrt(exp(tapply(log(doriginal$P.nev+1),list(doriginal$sexo,doriginal$atrativo,doriginal$local),var)))

modell<- glmer(P.nev~local+sexo+atrativo+local:sexo+sexo:atrativo+(1|noite)+(1|ponto:local),family = poisson(link=log),data=doriginal)

summary(modell)

drop1(modell,test="Chisq")

modellb<- glmer(P.nev~local+sexo+atrativo+local:sexo+(1|noite)+(1|ponto:local),family = poisson(link=log),data=doriginal)

summary(modellb)

drop1(modellb,test="Chisq")

# Modelo final
modellc<- glmer(P.nev~local+sexo+local:sexo+(1|noite)+(1|ponto:local),family = poisson(link=log),data=doriginal)

summary(modellc)

dispersion_glmer(modellc)

par(mfrow=c(2,2))

qqnorm(resid(modellc), main="normal qq-plot, residuals")

qqline(resid(modellc))

qqnorm(ranef(modellc)$`ponto:local`[,1])

qqline(ranef(modellc)$`ponto:local`[,1])

qqnorm(ranef(modellc)$noite[,1])

qqline(ranef(modellc)$noite[,1])

plot(fitted(modellc), resid(modellc)) #residuals vs fitted

abline(h=0)

#####

# Medias Observadas
tapply(matrix(doriginal$P.nev,nc=1),list(doriginal$sexo,doriginal$local),mean)

tapply(matrix(doriginal$P.nev,nc=1),list(doriginal$sexo,doriginal$local),sd)

# Medias Geometricas observadas
exp(tapply(log(matrix(doriginal$P.nev+1,nc=1)),list(doriginal$sexo,doriginal$local),mean))

```

```

exp(tapply(log(matrix(doriginal$P.nev+1,nc=1)),list(doriginal$sexo,doriginal$local),sd))

#####

# Medias ajustadas ou preditas pelo modelo

tapply(matrix(fitted(model1c),nc=1),list(doriginal$sexo,doriginal$local),mean)

# Podemos calcular assim também

# tapply(predict(model1c,re.form=~(1|noite)+(1|ponto:local),type="response"),list(doriginal$sexo,doriginal$local),mean)

# Aproximando os erros padrão

X <- model.matrix(model1c)

beta<- matrix(fixef(model1c),nc=1)

pred<- X%*%beta

# Desvios padrao aproximados: Var da Parte fixa mais componentes aleatórios

Varlink <- diag(X%*%vcov(model1c)%*%t(X))+.1466+.7672

se<- sqrt(tapply(Varlink,list(doriginal$sexo,doriginal$local),mean))

m <- tapply(matrix(predict(model1c,re.form=~(1|noite)+(1|ponto:local),type="link"),nc=1),list(doriginal$sexo,doriginal$local),mean)

se<- as.numeric(c(se[1,],se[2,]))

y <- as.numeric(c(m[1,],m[2,]))

sex<- factor(rep(c("M","F"),c(4,4)))

location<- factor(rep(c("F1","F2","F3","P1"),2))

medias<- data.frame(cbind(y,se))

medias$sex <- sex

medias$loc <- location

medias$l1 <- medias$y-1*medias$se

medias$l2 <- medias$y+1*medias$se

m <- tapply(matrix(predict(model1c,re.form=NA,type="response"),nc=1),list(doriginal$sexo,doriginal$local),mean)

ic1 <- confint(model1c)

rr1 <- data.frame(exp(cbind(ic1[8:10,],fixef(model1c)[6:8])))

colnames(rr1)<-c("X1", "X2", "X3")

rr1$loc <- factor(c("F2/F1","F3/F1","P1/F1"))

x11()

p1 <- ggplot(rr1, aes(x=loc, y=X3)) + geom_errorbar(aes(ymin=X1, ymax=X2), width=.1) + geom_line() + geom_point() + geom_hline(mapping = NULL, data = NULL, yintercept =1,col=2,lty=2)+ xlab("Location") + ylab("Relative capture rates of Female/Male for P. nevesi")

p1 + theme(panel.background = element_rect(fill = "white", colour = "grey50"),axis.title.x=element_text(size=14),axis.title.y=element_text(size=14))

# Negative binomial

model1d<- glmer.nb(P.nev~local+sexo+local:sexo+(1|noite)+(1|ponto:local),data=doriginal)

```

```
summary(model1d)

#####

# Analise para Ny. whitmani

x11()

par(mfrow=c(2,1),mar = c(2, 4, 1, 1) + 0.1)

with(doriginal[doriginal$sexo==1,],boxplot(N.whi~atrativo*local,ylab=expression(italic("Ny. whitmani")~abundance), pars=list(boxwex=0.3),names=legendax,las=1,cex.axis = 0.6,border=1)) mtext(side=2,line=2,at=100,"(Male)",cex=.8)

with(doriginal[doriginal$sexo==2,],boxplot(N.whi~atrativo*local,ylab=expression(italic("Ny. whitmani")~abundance), pars=list(boxwex=0.3),names=legendax,las=1,cex.axis = 0.6,border=1)) mtext(side=2,line=2,at=75,"(Female)",cex=.8)

par(mfrow=c(2,1),mar = c(2, 4, 1, 1) + 0.1)

with(doriginal[doriginal$sexo==1,],boxplot(log(N.whi+1)~atrativo*local,ylab=expression(Log(italic("Ny. whitmani"))~abundance), pars=list(boxwex=0.3),names=legendax,las=1,cex.axis = 0.6,border=1)) mtext(side=2,line=2,at=2.5,"(Male)",cex=.8)

with(doriginal[doriginal$sexo==2,],boxplot(log(N.whi+1)~atrativo*local,ylab=expression(Log(italic("Ny. whitmani"))~abundance), pars=list(boxwex=0.3),names=legendax,las=1,cex.axis = 0.6,border=1)) mtext(side=2,line=2,at=2.5,"(Female)",cex=.8)

# Analise para Ny. whitmani

# Medias observadas originais

tapply(doriginal$N.whi,list(doriginal$sexo,doriginal$atrativo,doriginal$local),mean)

# Desvio padrão

tapply(doriginal$N.whi,list(doriginal$sexo,doriginal$atrativo,doriginal$local),sd)

# Medias observadas na escala log

tapply(log(doriginal$N.whi+1),list(doriginal$sexo,doriginal$atrativo,doriginal$local),mean)

# Desvio padrão

tapply(log(doriginal$N.whi+1),list(doriginal$sexo,doriginal$atrativo,doriginal$local),sd)

# Medias observadas geométricas

exp(tapply(log(doriginal$N.whi+1),list(doriginal$sexo,doriginal$atrativo,doriginal$local),mean))

# Desvio padrão

sqrt(exp(tapply(log(doriginal$N.whi+1),list(doriginal$sexo,doriginal$atrativo,doriginal$local),var)))

model2<- glmer(N.whi~local+sexo+atrativo+local:sexo+sexo:atrativo+(1|noite)+(1|ponto:local),family = poisson, data=doriginal, control=glmerControl(optimizer= "optimx", optCtrl = list(method="nlminb"))

drop1(model2,test="Chisq")

summary(model2)

x11()

par(mfrow=c(2,2))

qqnorm(resid(model2), main="normal qq-plot, residuals")

qqline(resid(model2))
```

```

qqnorm(ranef(model2)$`ponto:local`[,1])
qqline(ranef(model2)$`ponto:local`[,1])
qqnorm(ranef(model2)$noite[,1])
qqline(ranef(model2)$noite[,1])
plot(fitted(model2), resid(model2)) #residuals vs fitted
abline(h=0)

#####
# Medias Observadas
tapply(matrix(doriginal$N.whi,nc=1),list(doriginal$sexo,doriginal$local),mean)
tapply(matrix(doriginal$N.whi,nc=1),list(doriginal$sexo,doriginal$local),sd)
tapply(matrix(doriginal$N.whi,nc=1),list(doriginal$sexo,doriginal$atrativo),mean)
tapply(matrix(doriginal$N.whi,nc=1),list(doriginal$sexo,doriginal$atrativo),sd)

# Medias Geometricas observadas
exp(tapply(log(matrix(doriginal$N.whi+1,nc=1)),list(doriginal$sexo,doriginal$local),mean))
exp(tapply(log(matrix(doriginal$N.whi+1,nc=1)),list(doriginal$sexo,doriginal$local),sd))
exp(tapply(log(matrix(doriginal$N.whi+1,nc=1)),list(doriginal$sexo,doriginal$atrativo),mean))
exp(tapply(log(matrix(doriginal$N.whi+1,nc=1)),list(doriginal$sexo,doriginal$atrativo),sd))

#####
X <- model.matrix(model2)
beta<- matrix(fixef(model2),nc=1)
pred<- X%*%beta

# Erros padrão aproximados: Var da Parte fixa mais componentes aleatórios
Varlink <- diag(X%*%vcov(model2)%*%t(X))+0.2862+0.5272

# Medias ajustadas ou previstas pelo modelo e seus erros
tapply(matrix(fitted(model2),nc=1),list(doriginal$sexo,doriginal$local),mean)
exp(sqrt(tapply(Varlink,list(doriginal$sexo,doriginal$local),mean)))
tapply(matrix(fitted(model2),nc=1),list(doriginal$sexo,doriginal$atrativo),mean)
exp(sqrt(tapply(Varlink,list(doriginal$sexo,doriginal$atrativo),mean)))

#####
# Negative binomial
model2b<- glmer.nb(N.whi~local+sexo+atrativo+local:sexo+atrativo:sexo+(1|noite)+(1|
ponto:local),data=doriginal, control=glmerControl(optimizer= "optimx", optCtrl = l
ist(method="nlnmb")) )

summary(model2b)

x11()

par(mfrow=c(2,2))
qqnorm(resid(model2b), main="normal qq-plot, residuals")
qqline(resid(model2b))

```



```

qqnorm(ranef(model2b)$`ponto:local`[,1])
qqline(ranef(model2b)$`ponto:local`[,1])
qqnorm(ranef(model2b)$noite[,1])
qqline(ranef(model2b)$noite[,1])
plot(fitted(model2b), resid(model2b)) #residuals vs fitted
abline(h=0)
drop1(model2b,test="Chisq")
doriginal$atrativo <- relevel(doriginal$atrativo, ref = "Lss")
model2c<- glmer.nb(N.whi~local+sexo+atrativo+local:sexo+(1|noite)+(1|ponto:local),d
ata=doriginal, control=glmerControl(optimizer= "bobyqa"))
summary(model2c)
drop1(model2c,test="Chisq")
#####
X <- model.matrix(model2c)
beta<- matrix(fixef(model2c),nc=1)
pred<- X%*%beta
# Erros padrao aproximados: Var da Parte fixa mais componentes aleatórios
Varlink <- diag(X%*%vcov(model2c)%*%t(X))+0.1288+0.4056
# Medias ajustadas ou preditas pelo modelo e seus erros
tapply(matrix(fitted(model2c),nc=1),list(doriginal$sexo,doriginal$local),mean)
exp(sqrt(tapply(Varlink,list(doriginal$sexo,doriginal$local),mean)))
tapply(matrix(fitted(model2c),nc=1),list(doriginal$atrativo),mean)
exp(sqrt(tapply(Varlink,list(doriginal$atrativo),mean)))
beta2<- fixef(model2c)[6:10]
se<- sqrt(diag(vcov(model2c))[6:10])
ic2<- cbind(beta2-1.96*se,beta2+1.96*se)
ic2
rr2 <- data.frame(exp(cbind(ic2,beta2)))[3:5,]
colnames(rr2) <- c("X1","X2","X3")
rr2$loc <- factor(c("F2/F1","F3/F1","P1/F1"))
x11()
p2 <- ggplot(rr2, aes(x=loc, y=X3)) +
  geom_errorbar(aes(ymin=X1, ymax=X2), width=.1) +
  geom_line() +
  geom_point() +
  geom_hline(mapping = NULL, data = NULL, yintercept=1,col=2,lty=2)+
  xlab("Location") +
  ylab("Relative capture rates of Female/Male for Ny. whitmani")
p2 + theme(panel.background = element_rect(fill = "white", colour = "grey50"),axis.
title.x=element_text(size=14)

```

```
,axis.title.y=element_text(size=14))

#####

# Analise para Ny. antunesi

x11()

par(mfrow=c(2,1),mar = c(2, 4, 1, 1) + 0.1)

with(doriginal[doriginal$sexo==1,],boxplot(N.ant~atrativo*local,ylab=expression(italic("Ny. antunesi")~abundance), pars=list(boxwex=0.3),names=legendax,las=1,cex.axis = 0.6,border=1))

mtext(side=2,line=2,at=30,"(Male)",cex=.8)

with(doriginal[doriginal$sexo==2,],boxplot(N.ant~atrativo*local,ylab=expression(italic("Ny. antunesi")~abundance), pars=list(boxwex=0.3),names=legendax,las=1,cex.axis = 0.6,border=1)) mtext(side=2,line=2,at=20,"(Female)",cex=.8)

par(mfrow=c(2,1),mar = c(2, 4, 1, 1) + 0.1)

with(doriginal[doriginal$sexo==1,],boxplot(log(N.ant+1)~atrativo*local,ylab=expression(Log(italic("Ny. antunesi"))~abundance), pars=list(boxwex=0.3),names=legendax,las=1,cex.axis = 0.6,border=1))

mtext(side=2,line=2,at=2,"(Male)",cex=.8)

with(doriginal[doriginal$sexo==2,],boxplot(log(N.ant+1)~atrativo*local,ylab=expression(Log(italic("Ny. antunesi"))~abundance), pars=list(boxwex=0.3),names=legendax,las=1,cex.axis = 0.6,border=1))

mtext(side=2,line=2,at=2,"(Female)",cex=.8)

# Analise para Ny. antunesi

# Medias observadas originais

tapply(doriginal$N.ant,list(doriginal$sexo,doriginal$atrativo,doriginal$local),mean)

# Desvio padrão

tapply(doriginal$N.ant,list(doriginal$sexo,doriginal$atrativo,doriginal$local),sd)

# Medias observadas na escala log

tapply(log(doriginal$N.ant+1),list(doriginal$sexo,doriginal$atrativo,doriginal$local),mean)

# Desvio padrão

tapply(log(doriginal$N.ant+1),list(doriginal$sexo,doriginal$atrativo,doriginal$local),sd)

# Medias observadas geométricas

exp(tapply(log(doriginal$N.ant+1),list(doriginal$sexo,doriginal$atrativo,doriginal$local),mean))

# Desvio padrão

sqrt(exp(tapply(log(doriginal$N.ant+1),list(doriginal$sexo,doriginal$atrativo,doriginal$local),var)))

model3<- glmer(N.ant~sexo+atrativo+local+local:sexo+sexo:atrativo+(1|noite)+(1|ponto:local),family = poisson, data=doriginal, control=glmerControl(optimizer= "optimx", optCtrl = list(method="nlnmb")))

summary(model3)

drop1(model3,test="Chisq")

x11()
```

```

par(mfrow=c(2,2))
qqnorm(resid(model3), main="normal qq-plot, residuals")
qqline(resid(model3))
qqnorm(ranef(model3)$`ponto:local`[,1])
qqline(ranef(model3)$`ponto:local`[,1])
qqnorm(ranef(model3)$noite[,1])
qqline(ranef(model3)$noite[,1])
plot(fitted(model3), resid(model3)) #residuals vs fitted
abline(h=0)

#####
# Medias Observadas
tapply(matrix(doriginal$N.ant,nc=1),list(doriginal$sexo,doriginal$local),mean)
tapply(matrix(doriginal$N.ant,nc=1),list(doriginal$sexo,doriginal$local),sd)
tapply(matrix(doriginal$N.ant,nc=1),list(doriginal$sexo,doriginal$atrativo),mean)
tapply(matrix(doriginal$N.ant,nc=1),list(doriginal$sexo,doriginal$atrativo),sd)
# Medias Geométricas observadas
exp(tapply(log(matrix(doriginal$N.ant+1,nc=1)),list(doriginal$sexo,doriginal$local),mean))
exp(tapply(log(matrix(doriginal$N.ant+1,nc=1)),list(doriginal$sexo,doriginal$local),sd))
exp(tapply(log(matrix(doriginal$N.ant+1,nc=1)),list(doriginal$sexo,doriginal$atrativo),mean))
exp(tapply(log(matrix(doriginal$N.ant+1,nc=1)),list(doriginal$sexo,doriginal$atrativo),sd))

#####
X <- model.matrix(model3)
beta<- matrix(fixef(model3),nc=1)
pred<- X%*%beta
# Erros padrão aproximados: Var da Parte fixa mais componentes aleatórios
Varlink <- diag(X%*%vcov(model3)%*%t(X))+0+0.2649
# Medias ajustadas ou preditas pelo modelo e seus erros
tapply(matrix(fitted(model3),nc=1),list(doriginal$sexo,doriginal$local),mean)
exp(sqrt(tapply(Varlink,list(doriginal$sexo,doriginal$local),mean)))
tapply(matrix(fitted(model3),nc=1),list(doriginal$sexo,doriginal$atrativo),mean)
exp(sqrt(tapply(Varlink,list(doriginal$sexo,doriginal$atrativo),mean)))

#####
# Negative binomial
model3b<- glmer.nb(N.ant~local+sexo+atrativo+local:sexo+atrativo:sexo+(1|noite)+(1|
ponto:local),data=doriginal, control=glmerControl(optimizer= "optimx", optCtrl = l
ist(method="nlnmb"))
summary(model3b)
x11()

```

```

par(mfrow=c(2,2))
qqnorm(resid(model3b), main="normal qq-plot, residuals")
qqline(resid(model3b))
qqnorm(ranef(model3b)$`ponto:local`[,1])
qqline(ranef(model3b)$`ponto:local`[,1])
qqnorm(ranef(model3b)$noite[,1])
qqline(ranef(model3b)$noite[,1])
plot(fitted(model3b), resid(model3b)) #residuals vs fitted
abline(h=0)
drop1(model3b,test="Chisq")

model3c<- glmer.nb(N.ant~local+sexo+atrativo+local:sexo+(1|noite)+(1|ponto:local),d
ata=doriginal, control=glmerControl(optimizer= "optimx", optCtrl = list(method="nlm
inb"))

summary(model3c)
drop1(model3c,test="Chisq")

model3d<- glmer.nb(N.ant~local+sexo+local:sexo+(1|noite)+(1|ponto:local),
data=doriginal, control=glmerControl(optimizer= "bobyqa"))
#control=glmerControl(optimizer= "optimx", optCtrl = list(method="nlminb"))
summary(model3d)
drop1(model3d,test="Chisq")

#####
X <- model.matrix(model3d)
beta<- matrix(fixef(model3d),nc=1)
pred<- X%*%beta

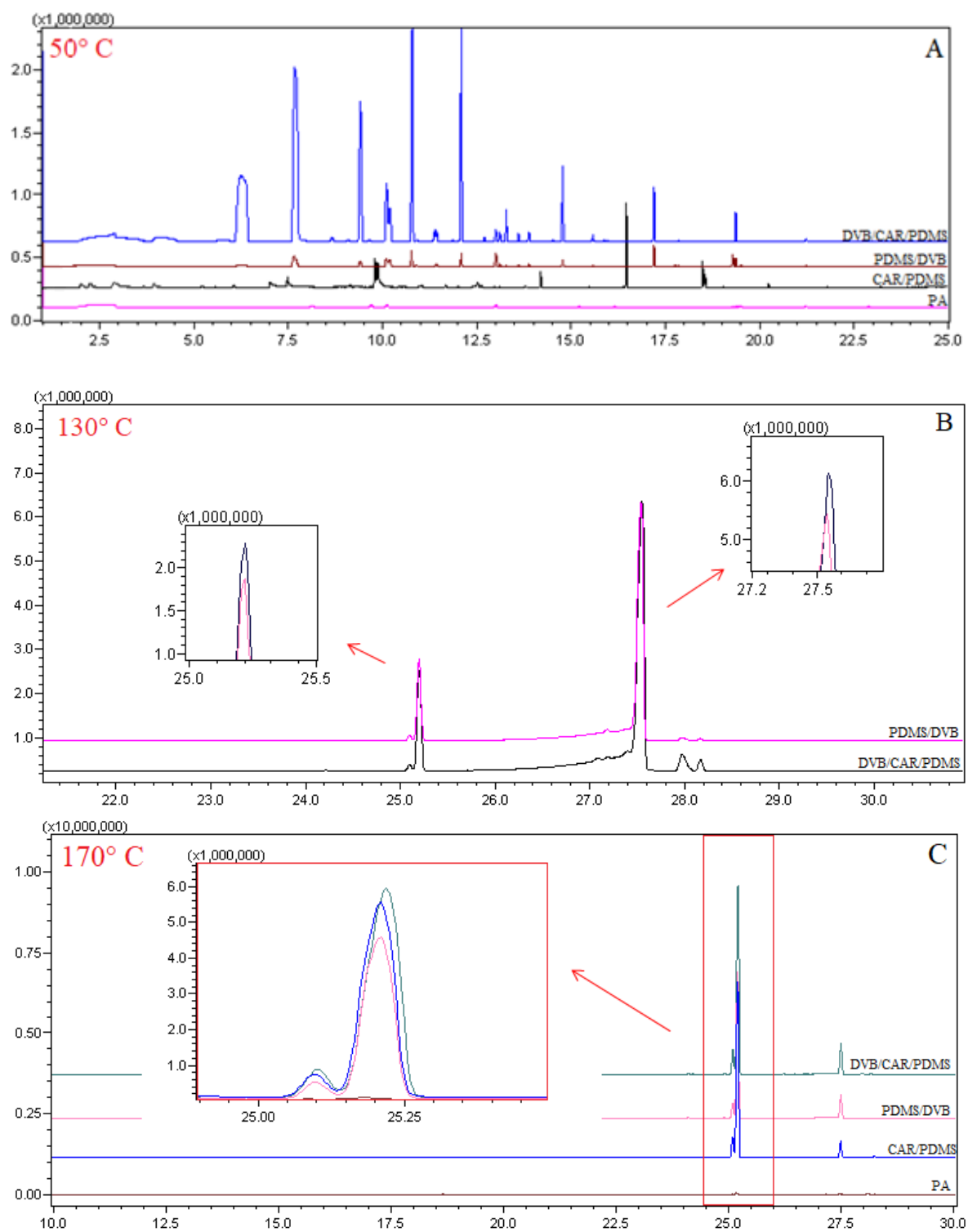
# Erros padrao aproximados: Var da Parte fixa mais componentes aleat³rios
Varlink <- diag(X%*%vcov(model3d)%*%t(X))+0.15617+0.03115

# Medias ajustadas ou preditas pelo modelo e seus erros
tapply(matrix(fitted(model3d),nc=1),list(doriginal$sexo,doriginal$local),mean)
exp(sqrt(tapply(Varlink,list(doriginal$sexo,doriginal$local),mean)))
tapply(matrix(fitted(model3d),nc=1),list(doriginal$atrativo),mean)
exp(sqrt(tapply(Varlink,list(doriginal$atrativo),mean)))
beta3<- fixef(model3d)[6:8]
se<- sqrt(diag(vcov(model3d))[6:8])
ic3<- cbind(beta3-1.96*se,beta3+1.96*se)
ic3
rr3 <- data.frame(exp(cbind(ic3,beta3)))
colnames(rr3) <- c("X1","X2","X3")
rr3$loc <- factor(c("F2/F1","F3/F1","P1/F1"))
x11()
p3 <- ggplot(rr3, aes(x=loc, y=X3)) +

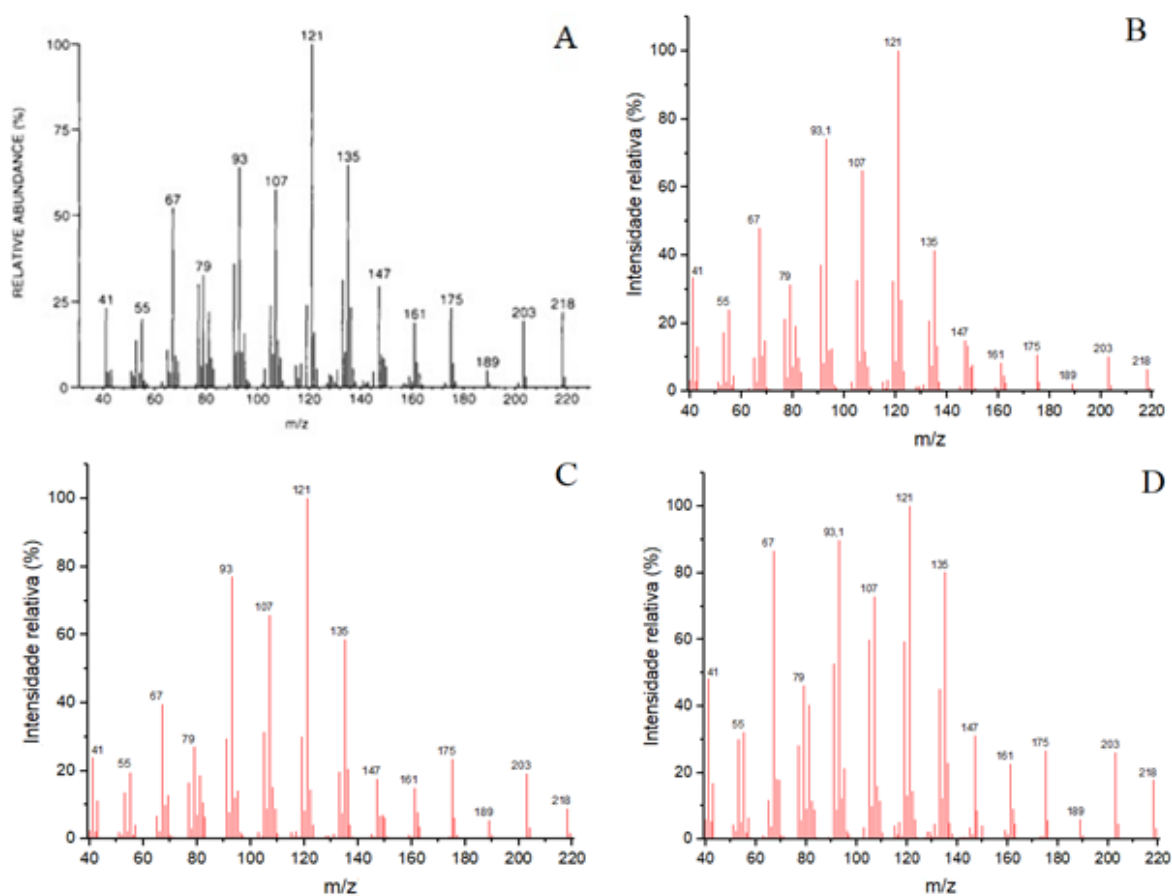
```

```
geom_errorbar(aes(ymin=X1, ymax=X2), width=.1) +  
geom_line() +  
geom_point() +  
geom_hline(mapping = NULL, data = NULL, yintercept=1,col=2,lty=2)+  
xlab("Location") +  
ylab("Relative capture rates of Female/Male for Ny. antunesi")  
p3 + theme(panel.background = element_rect(fill = "white", colour = "grey50"),axis.  
title.x=element_text(size=14),axis.title.y=element_text(size=14))
```

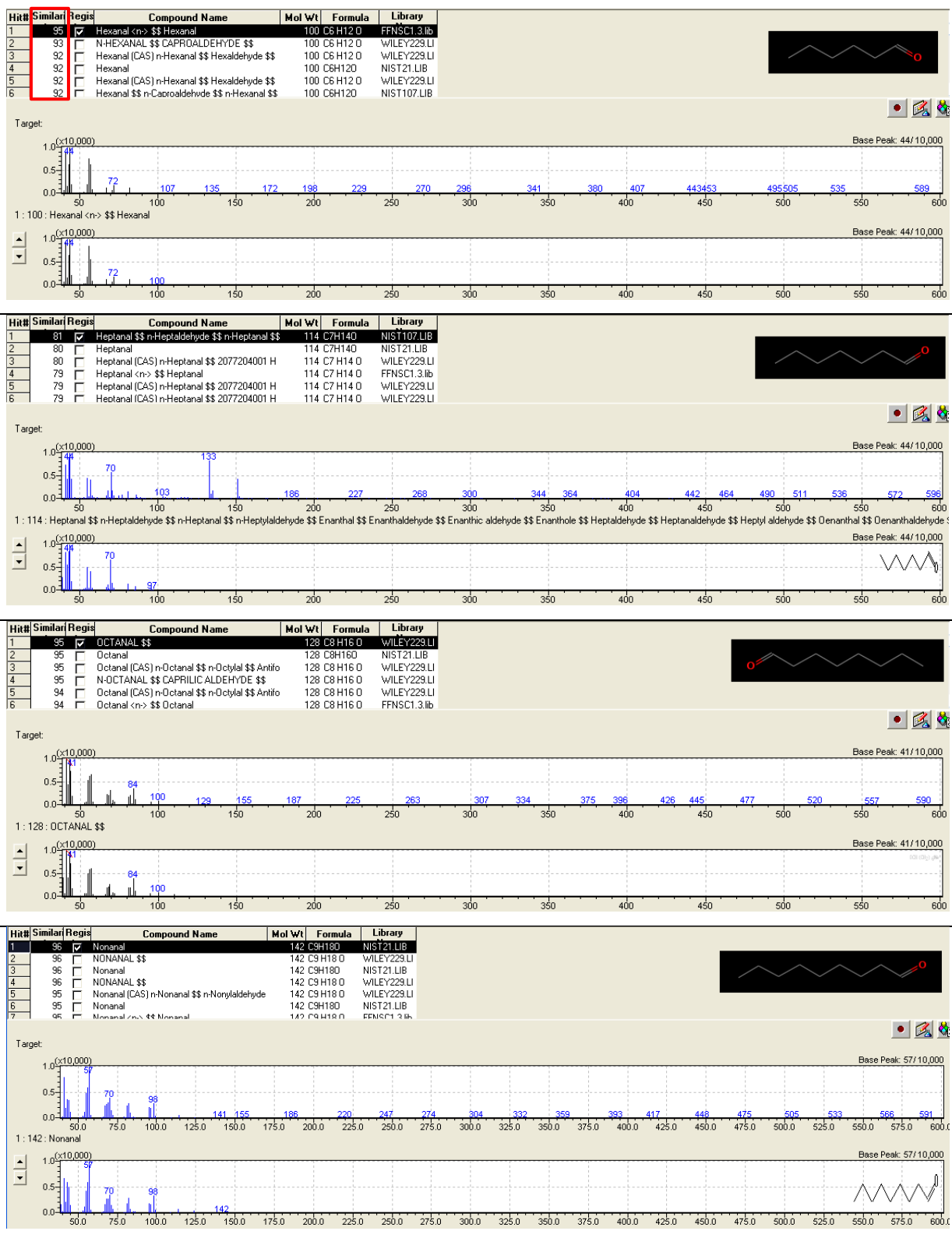
Apêndice 2. 1. Comparativo dos cromatogramas obtidos da extração, com diferentes revestimentos de fibras SPME, de um (01) macho de *Lutzomyia longipalpis* sob diferentes temperaturas de pré-equilíbrio. **A.** Temperatura 50° C; **B.** Temperatura 130° C, **C.** Temperatura 170° C. Fonte: Próprio autor.

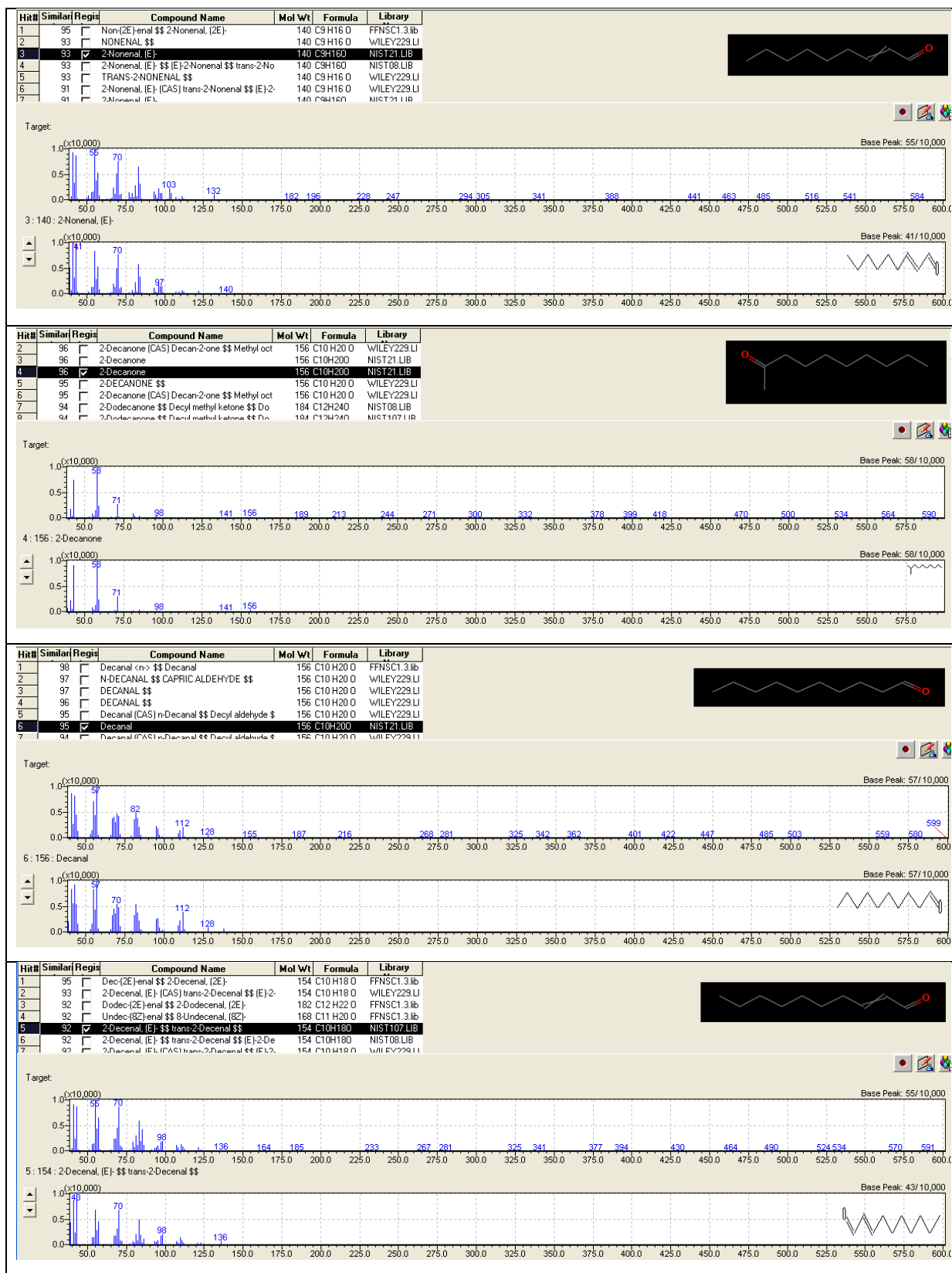


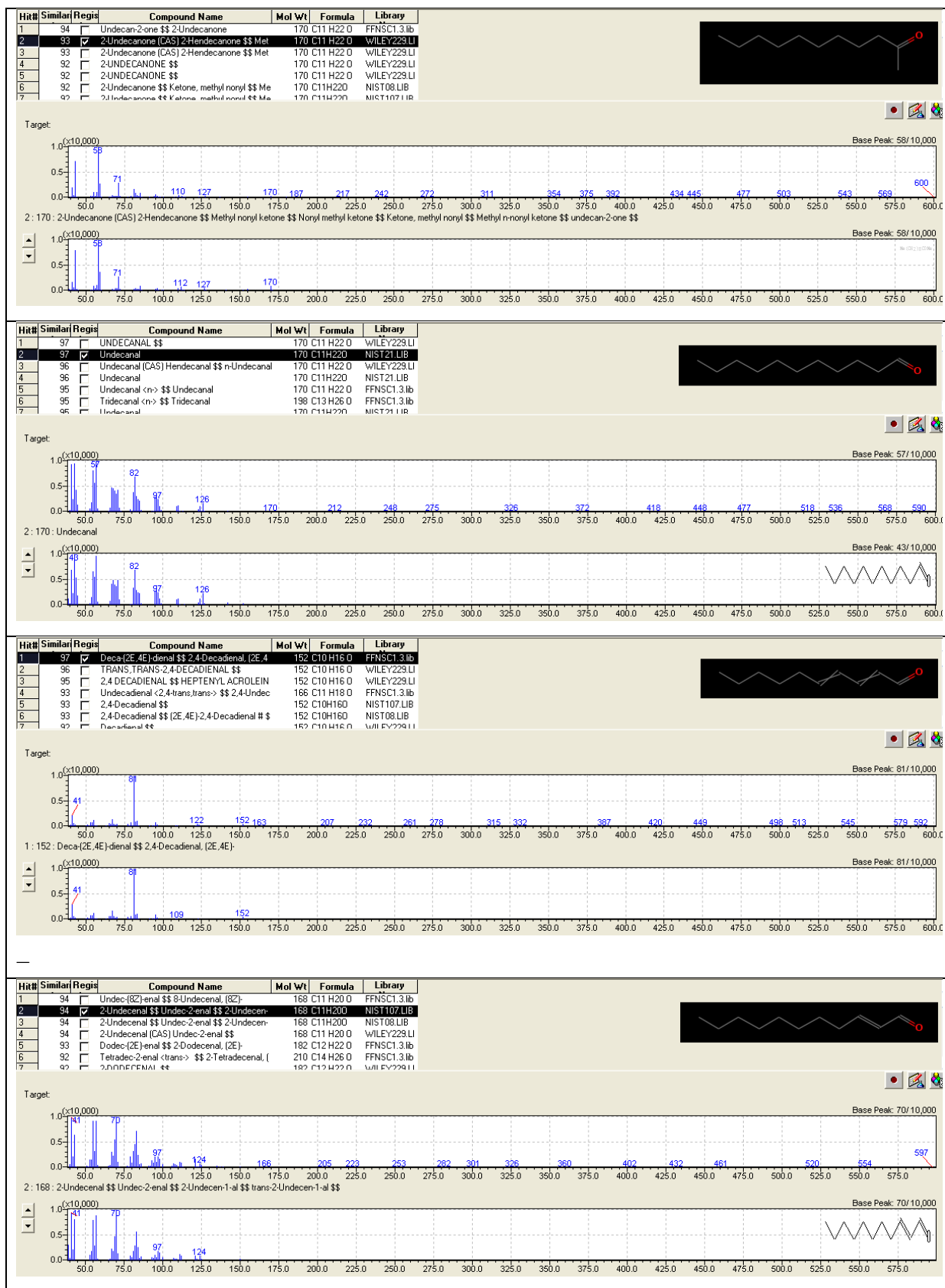
Apêndice 2. 2. Comparativo do **A.** Espectro de massa do feromônio sexual 9-metil-Germacreno-B (Lapinha, Brasil) (Hamilton et al., 1996), com o **B.** Espectro de massa do Pico 1; **C.** Espectro de massa do Pico 2, **D.** Espectro de massa do Pico 3; extraídos e identificados por HS-SPME-CG/MS em machos de *Lutzomyia longipalpis*; peso molecular dos três compostos: 218. Foi utilizada a fibra com revestimento DVB/CAR/PDMS. Temperatura de pré-equilíbrio 170° C x 45 min. Fonte: Próprio autor.

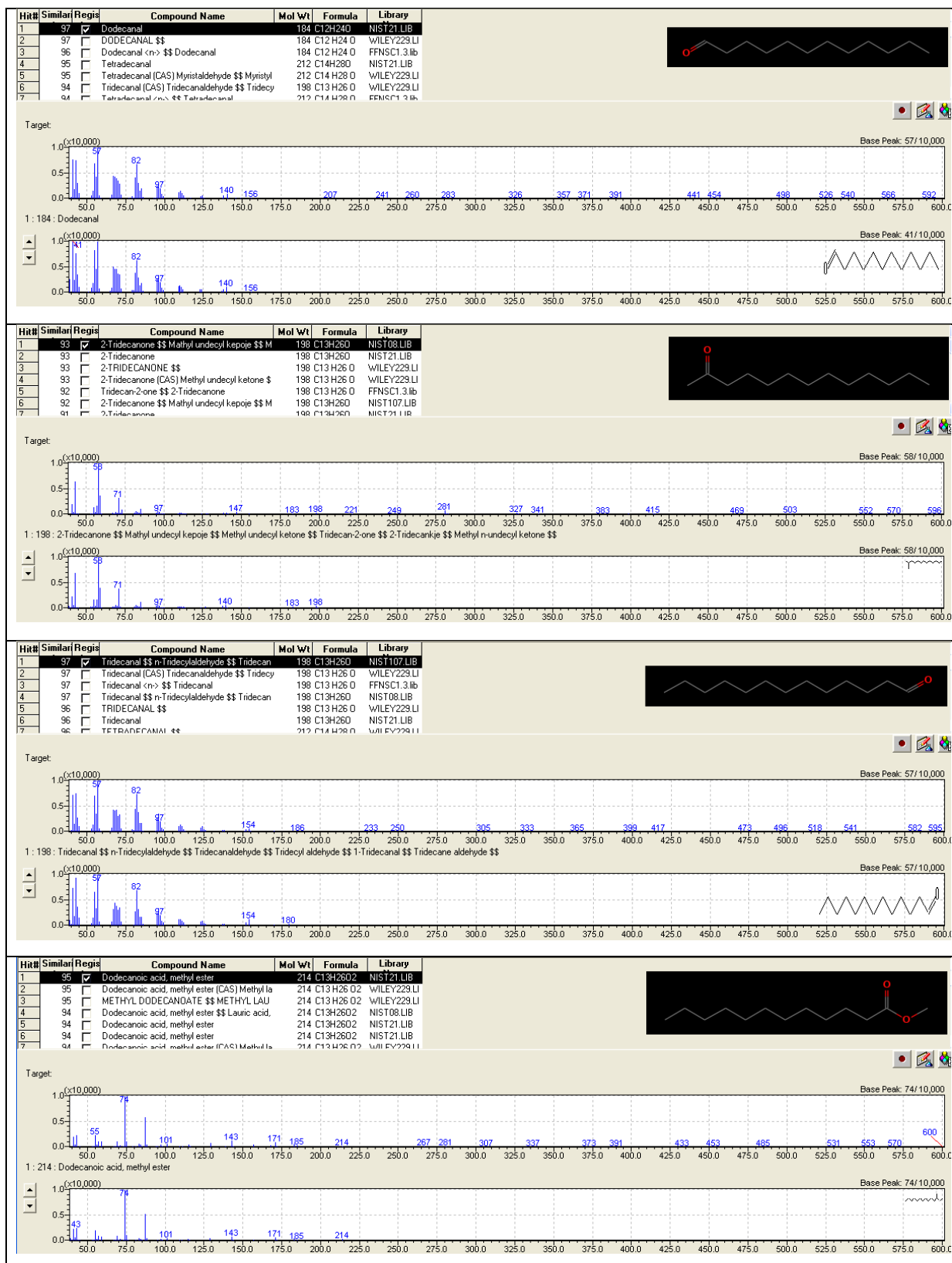


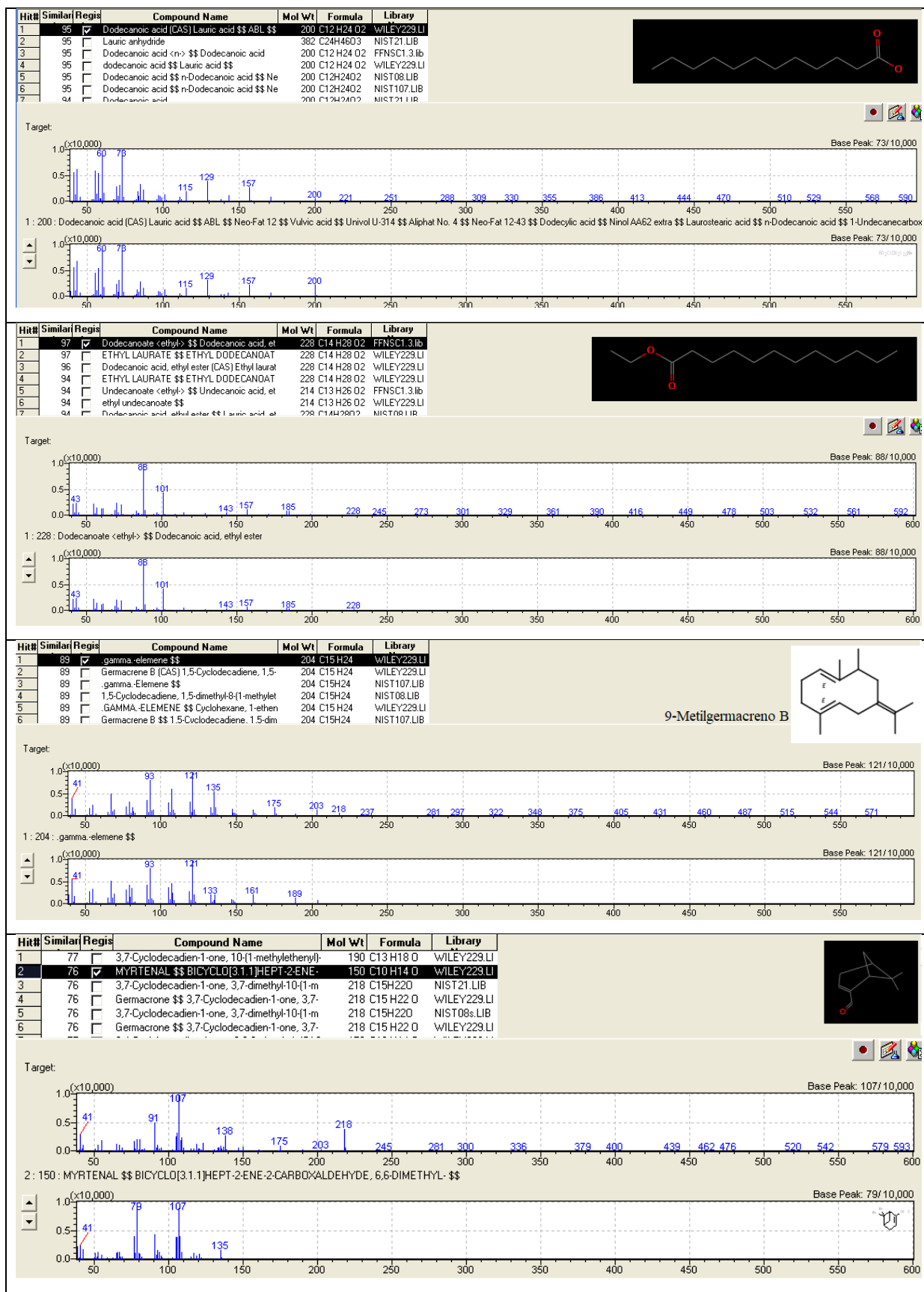
Apêndice 2. 3. Estruturas dos compostos voláteis identificados em fêmeas, ovos e machos das espécies *Lutzomyia longipalpis*, *Nyssomyia neivai*, *Nyssomyia whitmani*, *Pintomyia fischeri* e *Migonemyia migonei* e comparação dos respectivos espectros de massas com as bibliotecas utilizadas. Espectros superiores são das amostras e os inferiores das bibliotecas. Coluna da direita indica a similaridade (%).

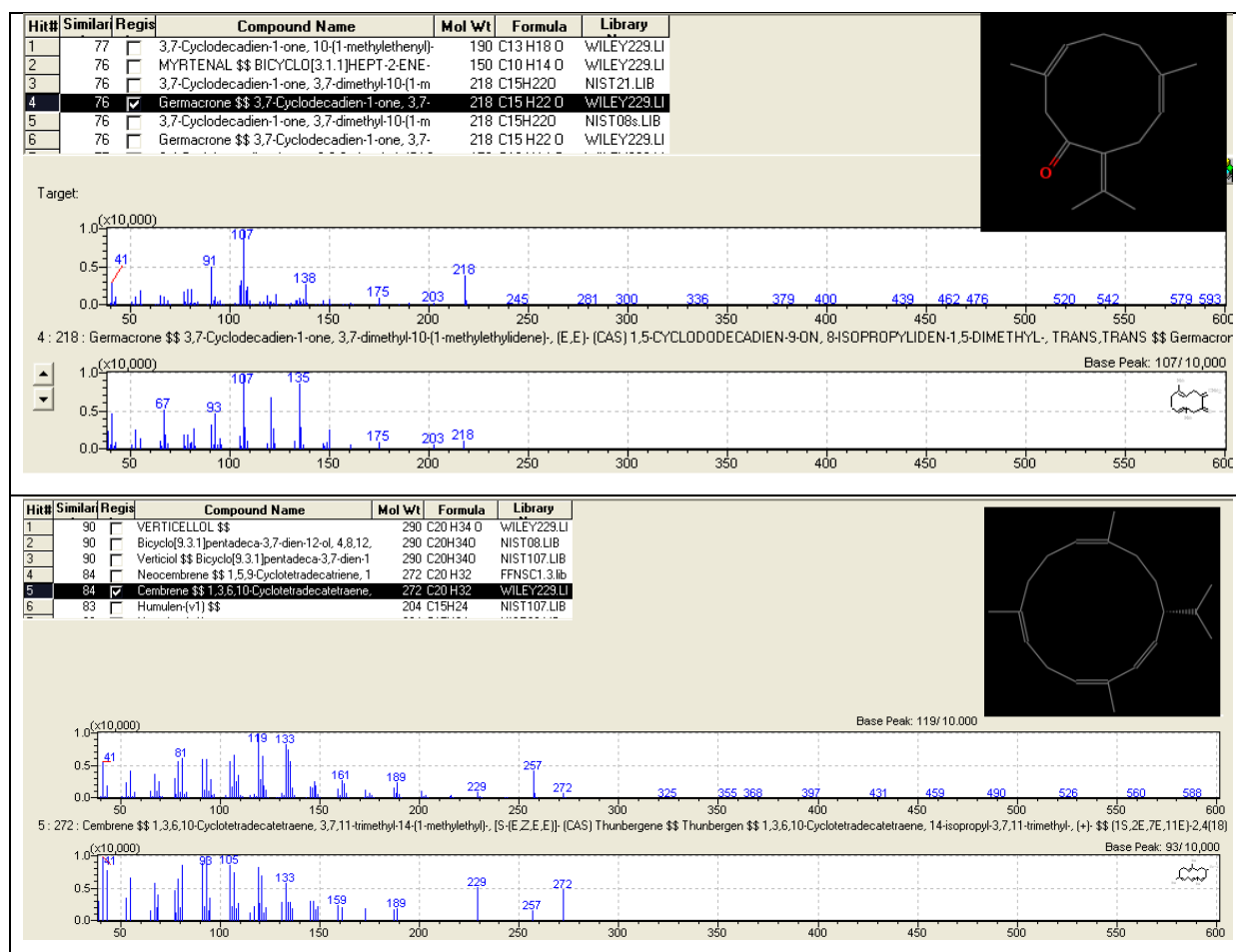




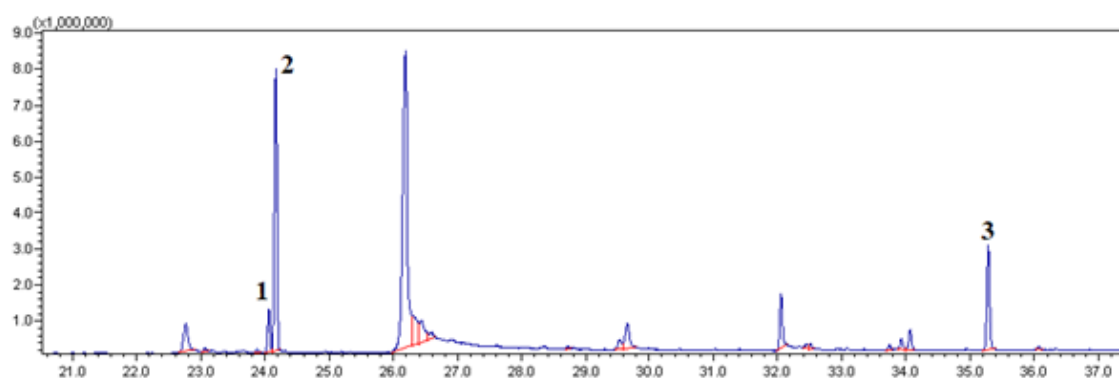




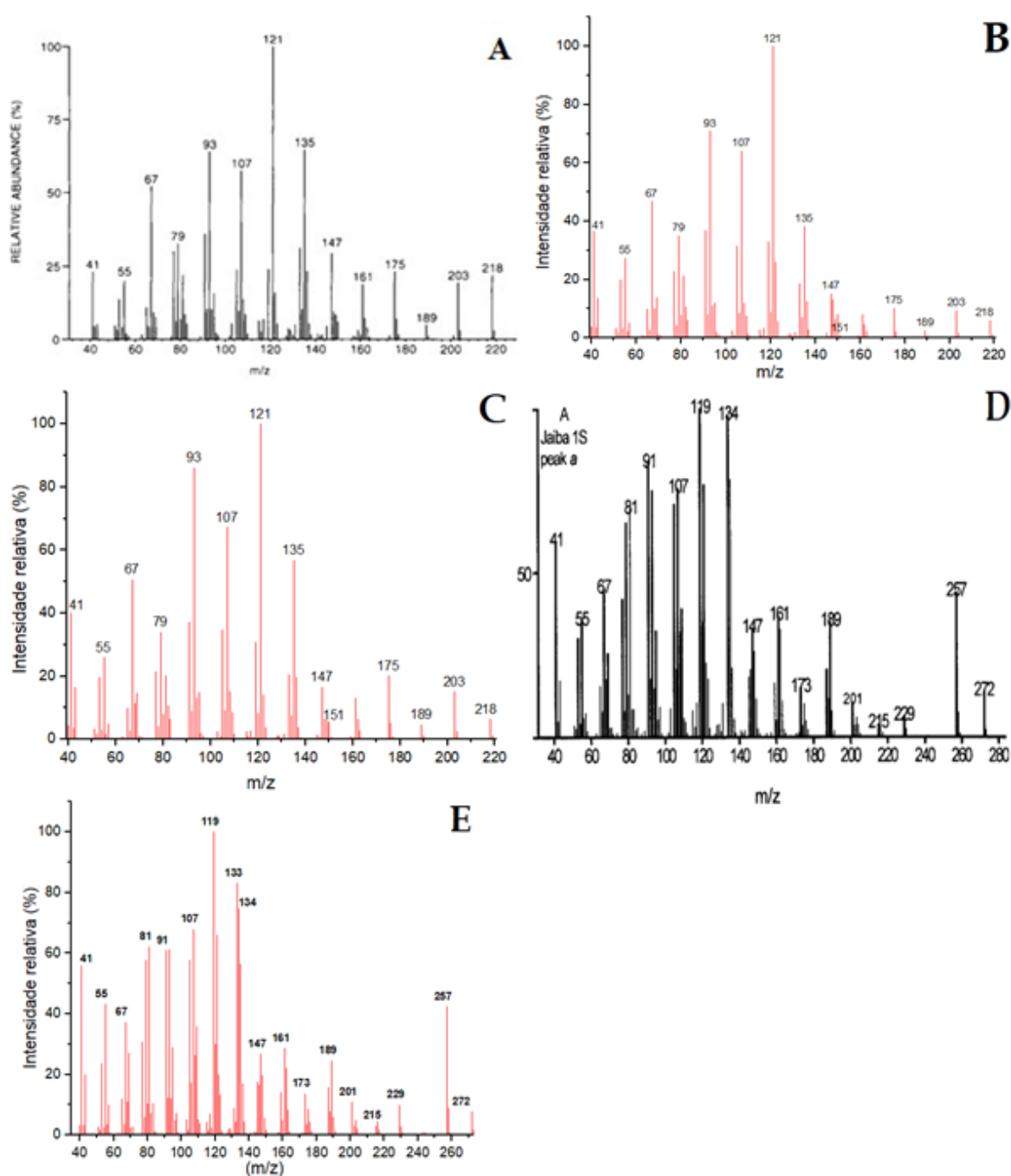




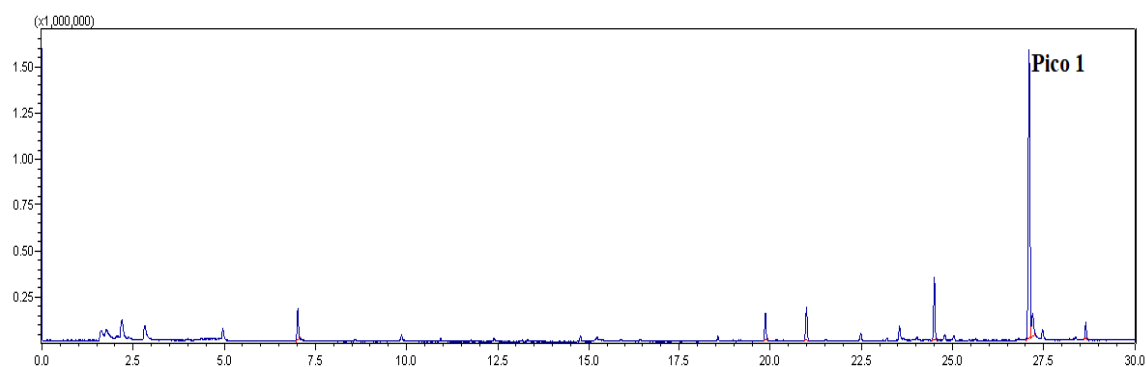
Apêndice 2. 4. Cromatograma (GC-MS) resultante da extração dos compostos voláteis de um macho de *Lu. longipalpis* da localidade de Porteirinha – MG; obtidos por HS-SPME-CG/MS. Fibra utilizada DVB/CAR/PDMS (cinza). Pico 1 e 2, compostos com similaridade 86% a Germacreno-B; Pico 3, composto com similaridade 84% similaridade ao cembreno.



Apêndice 2. 5. Comparativo do **A.** Espectro de massa do 9-metil-Germacreno-B descrito na literatura, com o **B.** Espectro de massa do Pico 1, com similaridade de 89% ao 9-metil-Germacreno-B, **C.** Espectro de massa do Pico 2, com similaridade de 89% ao 9-metil-Germacreno-B, **D.** Espectro de massa do Cembreno-2 descrito na literatura, **E.** Espectro de massa do Pico 2, com similaridade de 84% ao cembreno, peso molecular 272. Extraídos em 01 macho de *Lutzomyia longipalpis*, Porteirinha - MG. Fibra utilizada DVB/CAR/PDMS. Temperatura de pré-equilíbrio 170° C/45 min. extração temperatura ambiente/45 min. Fonte: Próprio autor.



Apêndice 2. 6. Cromatograma (GC-MS) resultante da extração dos compostos voláteis de machos de campo de *Mg. migonei*, obtidos por HS-SPME-CG/MS. Fibra utilizada DVB/CAR/PDMS (cinza). Pico 1, composto identificado pela biblioteca Wiley como Mirtenal ou Germacrona, ambos com similaridade 76%.



ANEXOS

ANEXO 1. COMITÊ DE ÉTICA



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araraquara



C E R T I F I C A D O

Certificamos que a proposta intitulada "Manutenção das colônias de *Lutzomyia longipalpis* e *Nyssomyia neivai* (Diptera:Psychodidae)", registrada com o Protocolo CEUA/FCF/CAR: 21/2018, sob a responsabilidade dos Pesquisadores Vicente Estevam Machado e Dennys Ghenry Samillan Ortiz, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da UNESP em reunião de 24 de outubro de 2018.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Outubro de 2020
Espécie/linhagem/raça	Camundongo heterogênico Swiss
Nº de animais	120
Idade/Peso	1 mês 25g
Sexo	feminino
Origem	Biotério central da FCFAr/UNESP

Araraquara, 24 de outubro de 2018.

Profa. Dra. CARLA RAQUEL FONTANA
Coordenadora da CEUA

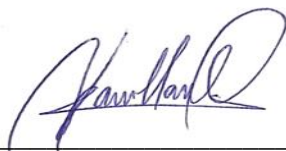


ANEXO 2. DECLARAÇÃO DE DIREITOS AUTORAIS**Declaração**

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **INVESTIGAÇÃO DA PRESENÇA DE FEROMÔNIOS EM QUATRO ESPÉCIES DE FLEBOTOMÍNEOS (DIPTERA: PSYCHODIDAE) E ATRATIVIDADE DE CAIROMÔNIOS HUMANOS EM CAMPO (STUDY ON PHEROMONES IN FOUR SPECIES OF PHLEBOTOMINE SAND FLIES (DIPTERA: PSYCHODIDAE) AND ATTRACTIVENESS OF HUMAN KAIROMONES IN FIELD)**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 03 de junho 2019

Assinatura : _____



Nome do(a) autor(a): **DENNYS GHENRY SAMILLAN ORTIZ**

RG n.º V812106Y

Assinatura : _____



Nome do(a) orientador(a): **MARA CRISTINA PINTO**

RG n.º 18567162